

Doença de Chagas

Triagem e diagnóstico sorológico
em unidades hemoterápicas
e laboratórios de saúde pública



Ministério da Saúde

Coordenação Nacional de DST e Aids
Coordenação de Sangue e Hemoderivados

MINISTÉRIO DA SAÚDE

José Serra

Ministro de Estado da Saúde

João Yunes

Secretário de Políticas de Saúde

Pedro Chequer

Coordenador Nacional de DST e Aids

Hélio Moraes de Souza

Coordenador Nacional de Sangue e Hemoderivados

Miriam Franchini e Hélio Moraes de Souza

Coordenadores do projeto TELELAB - Série Sangue

Autores:

Alejandro Luquetti

Eliana Furtado Moreira

Maria de Fátima Sampaio Gadelha

Yara de Miranda Gomes

Maria Lúcia Ricciotti Ribinik (pedagogia)

Maristela Arantes Marteleto (pedagogia)

Colaboradores:

Luiz Alberto Peregrino Ferreira

Maria Luiza Bazzo

Hélio Moraes

Doença de Chagas – Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. – Brasília: Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. 1998.
76. p. : il (Série TELELAB)

1. Doença de Chagas – Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública I. Coordenação Nacional de Doença Sexualidade Transmissíveis e Aids (Brasil) II. Série TELELAB

Apresentação

A Coordenação Nacional de DST e Aids e a Coordenação de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde, em nome do compromisso com a melhoria do atendimento à população, unem seus esforços a fim de promover o aperfeiçoamento dos profissionais dos laboratórios de saúde pública e das unidades hemoterápicas.

Nessa perspectiva, os cursos do Sistema de Educação a Distância – TELELAB, organizados numa abordagem favorável ao repensar da prática profissional, oferecem aos profissionais da saúde uma oportunidade de adquirir conhecimentos embasados em critérios técnico-científicos de qualidade para assegurar o padrão de excelência desejável no atendimento aos usuários dos serviços de saúde.

Queremos deixar registrado nosso agradecimento a todos os que contribuíram na produção dos vídeos e dos manuais que compõem os cursos. Esses especialistas de áreas tão diversas aproveitaram as diferenças para realizar um trabalho harmônico e integrado, o que reforça a nossa idéia de que é em equipe e em parceria que se constrói um sistema único de saúde com qualidade.

Aos alunos do TELELAB nossas boas vindas e votos de sucesso!

Pedro Chequer
Coordenador Nacional
de DST e Aids

Hélio Moraes de Souza
Coordenador Nacional de
Sangue e Hemoderivados

Seja bem-vindo(a)!

Você agora faz parte do TELELAB, um Sistema de Educação a Distância do Ministério da Saúde. Estão à sua disposição os seguintes cursos:

Cursos – TELELAB	Pré-requisitos
01 - Técnicas para Coleta de Secreções	-
02 - Técnicas para Coleta de Sangue	-
03 - Técnica de Coloração de Gram	Curso 01
04 - Cultura, Isolamento e Identificação de " <i>Neisseria gonorrhoeae</i> "	Curso 01 e Curso 03
05 - Diagnóstico Laboratorial da <i>Chlamydia</i>	Curso 01
06 - Diagnóstico Sorológico da Sífilis	Curso 02
07 - Diagnóstico Sorológico do HIV: Testes de Triagem	Curso 02
08 - Diagnóstico Sorológico do HIV: Testes Confirmatórios	Curso 02 e Curso 07
09 - Coleta de Sangue de Doadores	-
10 - Preparação de Hemocomponentes	Curso 09
11 - Doença de Chagas – Triagem e Diagnóstico Sorológico em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública	Curso 02
12 - HTLV- I/II – Triagem e Diagnóstico Sorológico em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública	Curso 02
13 - Hepatites Virais – Triagem e Diagnóstico Sorológico em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública	Curso 02
14 - Controle de Qualidade de Testes Sorológicos em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública	Curso 06 ou 07 ou 11 ou 12 ou 13
15 - Equipamentos - Utilização e Monitoramento em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública	Um dos cursos anteriores
16 - Biossegurança em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública	Um dos cursos anteriores

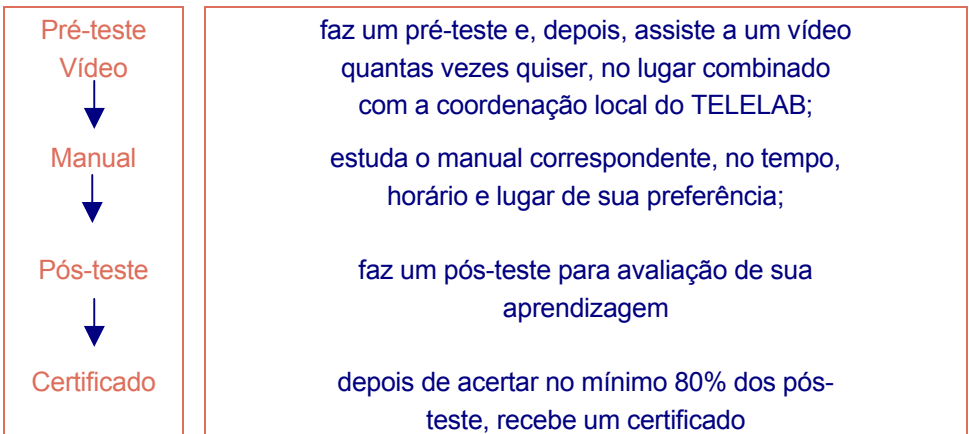
Observações:

1. Você se inscreve em um curso por vez, escolhido de acordo com seu interesse e/ou necessidade do serviço, respeitando os pré-requisitos identificados.
2. O curso Controle de Qualidade de Testes Sorológicos é complemento essencial para **todos** os cursos de **diagnóstico sorológico**. Ele deve ser feito imediatamente após a conclusão do primeiro desses cursos (06 ou 07 ou 11 ou 12 ou 13).
3. Os cursos de Equipamentos (15) e de Biossegurança (16) – são complementos essenciais para **todos** os outros cursos e devem ser feitos após o primeiro curso concluído por você.



Como funciona

Os cursos do TELELAB estão programados de modo a não interferir na sua rotina de trabalho e você tem **1 mês** para concluir cada curso que fizer. Em cada um deles, você:



Para esclarecimentos de dúvidas e sempre que precisar, comunique-se diretamente com:

TELELAB - CN-DST/AIDS - MS
Fax gratuito: 0800-61-2436

Ao final do curso "Doença de Chagas - Triagem e Diagnóstico Sorológico em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública", você será capaz de:

- ▼ identificar os procedimentos e as técnicas recomendadas pelo Ministério da Saúde para triagem sorológica de doadores de sangue e para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas;
- ▼ executar os testes para detecção da infecção pelo *T. Cruzi*, obedecendo a critérios técnicos e de controle de qualidade.

GUARDE ESTE MANUAL. ELE É SEU. USE-O!

Sumário

INTRODUÇÃO

A DOENÇA DE CHAGAS E MÉTODOS PARA DETECÇÃO DA INFECÇÃO PELO *T. CRUZI* 7

Introdução	9
o agente causador da doença de Chagas	11
formas de contaminação pelo <i>T. cruzi</i>	12
testes utilizados para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo <i>T. cruzi</i>	12
testes parasitológicos	12
testes sorológicos	12
testes sorológicos para detecção da infecção pelo <i>T. cruzi</i>	13

TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA – HAI 15

a reação de HAI	17
leitura da reação e critérios para definição de amostra reagente, não reagente e indeterminada	18
teste qualitativo e quantitativo – diluições	19
determinação de título de uma amostra no teste de HAI	20
materiais para realização do HAI qualitativo e quantitativo	21
procedimentos para realização do teste de HAI qualitativo e quantitativo	22
garantia de qualidade nos resultados do HAI	24

TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA – IFI 25

a reação de IFI	27
leitura da reação e critérios para definição de amostra reagente, não reagente e indeterminada	28
diluições da amostra para realização de IFI qualitativo e quantitativo	28
determinação do título de amostra no teste de IFI	30
necessidade de titulação do conjugado	31
materiais para realização do IFI qualitativo e quantitativo	32
armazenagem dos reagentes do IFI	32
realização da titulação do conjugado	33
interpretação dos resultados para determinação do título ideal do conjugado	36
realização do teste de IFI	38
garantia de qualidade dos resultados do IFI	40

TESTE DE ELISA	41
em que se baseia o ELISA	43
variações nos componentes do ELISA	43
tipo de ELISA utilizado no diagnóstico da infecção pelo <i>T. cruzi</i>	44
seqüência do ELISA indireto	44
definição de amostra reagente, não reagente e indeterminada no ELISA	45
equipamentos e materiais para realização do ELISA	46
procedimentos para executar o ELISA	46
medidas para garantir a qualidade dos resultados ELISA	48
TRIAGEM SOROLÓGICA DE DOADORES DE SANGUE EM UNIDADES E HEMOTERÁPICAS E DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO EM LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA	49
registro de amostras em unidades hemoterápicas	51
quantidade, acondicionamento e conservação das alíquotas em unidades hemoterápicas	52
triagem sorológica de doadores de sangue para a doença de Chagas	53
fluxograma para diagnóstico sorológico da doença de Chagas	58
FÓRMULAS	61
preparo de tampão fosfato (PBS) pH 7.2	63
solução de azul de Evans: solução estoque (0,1%)	64
preparo da solução PBS-AE a 0,01%	65
preparo da glicerina tamponada	65
ANEXOS	67
<i>Anexo 1 – Protocolo do Teste HAI</i>	69
<i>Anexo 2 – Protocolo do Teste IFI</i>	70
<i>Anexo 3 – Protocolo de ELISA</i>	71
BIBLIOGRAFIA	73



Introdução

A doença de Chagas, descrita em 1909, é uma parasitose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Esse parasita é transmitido ao homem por um inseto conhecido popularmente pelos nomes de barbeiro, chupão, procotó e outros.

O sanitarista brasileiro Carlos Justiniano Chagas descreveu sozinho, fato inédito na história da medicina, o ciclo completo da doença. Ele identificou o parasita, o transmissor, o reservatório animal dos parasitas e as manifestações clínicas da doença que levou o seu nome. Chagas denominou o parasita de *T. cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz.

A doença é freqüente na América Central e na América do Sul. No Brasil, a ocorrência dessa enfermidade, que acomete cerca de três milhões de brasileiros, é particularmente elevada em alguns estados como Minas Gerais, Goiás, Rio Grande do Sul, Bahia e Piauí.

Além da transmissão pelo barbeiro, a infecção pelo *T. cruzi* é transmitida também por via sangüínea.

O primeiro teste utilizado para a detecção da infecção pelo *T. cruzi* foi a reação de Fixação de Complemento, desenvolvida por Guerreiro e Machado, em 1913. Hoje, esse teste apresenta apenas valor histórico, dada a existência de testes sorológicos mais simples e mais precisos.

A utilização rotineira dos testes sorológicos em **unidades** hemoterápicas tem contribuído, de forma decisiva, para a redução do número de casos pós-transfusionais da infecção pelo *T. cruzi*.

Neste manual estão apresentados os testes recomendados, tanto em **unidades hemoterápicas**, para a triagem sorológica de doadores de sangue, quanto em **laboratórios de saúde pública**, para o diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. cruzi*, atendendo a critérios técnicos, de controle de qualidade e de biossegurança.



Introdução

A doença de Chagas e métodos para detecção da infecção pelo *T. Cruzi*



A doença de Chagas e os métodos de diagnóstico

Qual o agente causador da doença de Chagas?

Como você já sabe, o *Trypanosoma cruzi* é o parasita causador da doença de Chagas. Esse parasita é transmitido aos mamíferos (homens e animais) por insetos hematófagos como o *Triatoma infestans*, popularmente chamado barbeiro.

Inseto hematófago - inseto que se alimenta de sangue.

Em condições naturais, o barbeiro ingere formas sanguíneas do *T. cruzi* ao se alimentar em um hospedeiro infectado. Essas formas sanguíneas diferenciam-se e multiplicam-se no trato digestivo do inseto, dando origem aos tripomastigotas metacíclicos que são eliminados nas fezes do barbeiro. Como o inseto tem o hábito de defecar no momento da picada, as fezes contendo os parasitas infectam os seres humanos através de lesões na pele, pelo orifício da picada ou pelas mucosas.

Na Figura 1, você pode ver o barbeiro e uma forma sanguínea do *T. cruzi*.

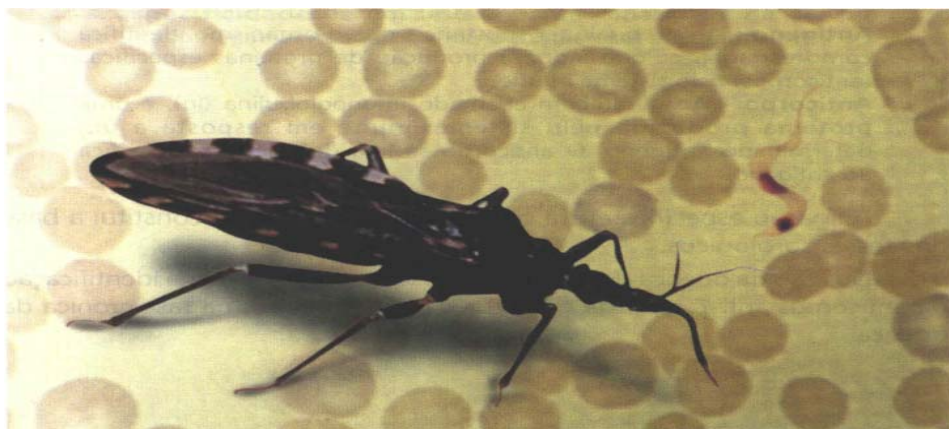


Figura 1 - *Triatoma infestans* e forma sanguínea do *T. cruzi*

Quais as principais formas de contaminação pelo *T. cruzi* por via sangüínea?

O *T. cruzi* é transmitido por via sangüínea, principalmente:

- ▼ nas transfusões com sangue contaminado,
- ▼ de mãe para filho (transmissão vertical);
- ▼ na infecção acidental em laboratório;
- ▼ nos transplantes de órgãos e tecidos.

Quais os testes utilizados para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo *T. cruzi*?

Para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo *T. cruzi* são utilizados os seguintes testes:

- ▼ **parasitológicos** diretos (exame a fresco do sangue, técnicas de concentração do parasita, etc.) Esses testes são indicados na fase aguda da doença, quando a parasitemia é elevada;
- ▼ **sorológicos**, são testes imunológicos que detectam no soro, antígenos ou anticorpos em vários tipos de infecção. Esses testes são utilizados para detecção da infecção pelo *T. cruzi* na fase crônica da doença.

Antígeno - Ag - é qualquer substância que o organismo identifica como estranha e que induz a produção de proteínas específicas (anticorpos) pelo sistema imune.

Anticorpo - Ac - também chamado imunoglobulina (Ig), é uma proteína produzida pelo sistema imune em resposta a um determinado antígeno. O anticorpo se liga de maneira específica ao antígeno.

A ligação específica entre o antígeno e o anticorpo constitui a base dos testes sorológicos.

No caso da doença de Chagas, esses testes baseiam-se na identificação de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG, predominantes na fase crônica da doença.



Há laboratórios que, além dos testes sorológicos, utilizam, na fase crônica, reações de amplificação dos ácidos nucleicos do parasita.

Amplificação de ácido nucleico - seqüência de reações que promove o aumento de cópias de uma molécula de DNA ou RNA.

Essas reações são utilizadas em laboratórios de pesquisa, mas ainda não estão disponíveis para a rede de laboratórios. Por isso, a partir daqui, serão enfocados os testes sorológicos que são rotineiramente empregados na detecção da infecção pelo *T. cruzi*.

Quais os testes sorológicos mais utilizados para a detecção da infecção pelo *T. cruzi*?

Devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, os testes sorológicos mais utilizados para a detecção da infecção pelo *T. cruzi* são:

1. Hemaglutinação Indireta (HAI);
2. Imunofluorescência Indireta (IFI);
3. ELISA (**E**nzyme **L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay).

A **sensibilidade** de um teste é a sua capacidade de dar um resultado positivo quando o indivíduo está verdadeiramente infectado.

A **especificidade** de um teste é a sua capacidade de dar um resultado negativo quando o indivíduo não está infectado.

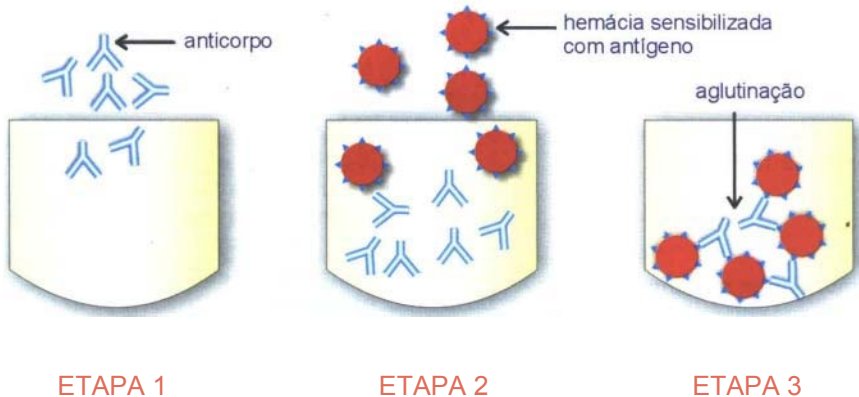


Teste de hemaglutinação indireta - HAI



Em que se baseia a reação de HAI?

A reação de HAI se baseia na aglutinação de hemácias sensibilizadas com antígeno *T. cruzi*, em presença de soro contendo anticorpos contra esse parasita. Veja na Figura 2.



ETAPA 1

ETAPA 2

ETAPA 3

Figura 2 - Representação esquemática de uma reação de hemaglutinação indireta (HAI).

Observe que:

- ▼ **na etapa 1**, adiciona-se a amostra, que, sendo reagente, contém anticorpos anti-*T. cruzi*. O suporte, em geral, é uma placa de microtitulação;

placa de microtitulação - produzida, geralmente, em poliestireno transparente com 96 cavidades ou em tiras (*strips*) de 8 ou 12 cavidades, com fundo em V ou em U.

- ▼ **na etapa 2**, adiciona-se hemácias sensibilizadas com antígeno de *T. cruzi*;
- ▼ **na etapa 3**, a reação antígeno-anticorpo é visualizada pela aglutinação das hemácias.

Como é feita a leitura da reação e quais os critérios para se considerar uma amostra reagente, não reagente ou indeterminada no teste de HAI?

A leitura é feita, a olho nu, com a placa de microtitulação colocada contra a luz ou em um espelho próprio. Veja, no Quadro 1, os critérios para a leitura.

Quadro 1 - Critérios para definir amostra reagente, não reagente ou indeterminada no teste de HAI

amostra reagente	hemácias distribuídas de maneira homogênea, em forma de tapete ou manto, ocupando área maior do que 50% do fundo da placa.
amostra não reagente	hemácia acumulada em formas de botão no fundo do poço.
amostra indeterminada	qualquer padrão diferente dos anteriores.

Confira esses critérios na Figura 3:

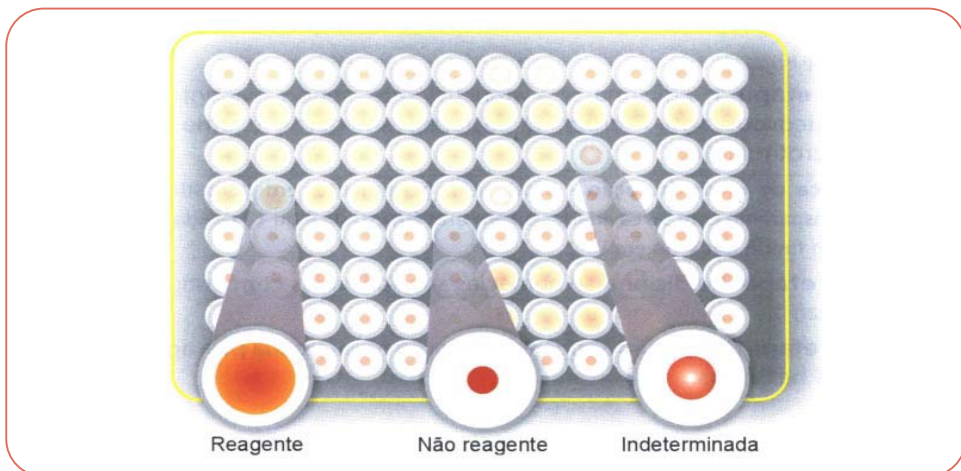


Figura 3 - Visualização de amostra reagente, não reagente e indeterminada na reação de HAI

O teste HAI pode ser qualitativo ou quantitativo.



Quando se utiliza o teste de HAI qualitativo e o HAI quantitativo ou para titulação?

- ▼ O teste de **HAI qualitativo** é utilizado para definir se uma amostra é **reagente** ou **não reagente**. A amostra de soro para a realização da HAI qualitativa é **diluída uma única vez**;
- ▼ O teste de **HAI quantitativo**, ou para titulação, é utilizado para **confirmar** os resultados das amostras **reagentes ou indeterminadas** no HAI qualitativo e para **definir o título** das amostras reagentes. Para a titulação é feita a **diluição seriada** das amostras de soro.

Como são feitas as diluições da amostra para o teste de HAI qualitativo e quantitativo?

O fabricante do conjunto diagnóstico fornece o diluente específico e define a diluição inicial da amostra para o teste qualitativo. As diluições da amostra para o teste quantitativo são preparadas, em geral, na razão 2 a partir da diluição do teste qualitativo. Acompanhe um exemplo:

Uma amostra foi **reagente** no HAI qualitativo na diluição única de 1/20 de acordo com as orientações do fabricante. Para o teste HAI quantitativo foram feitas cinco diluições da amostra a partir da diluição 1/20 como apresentado na Figura 4.

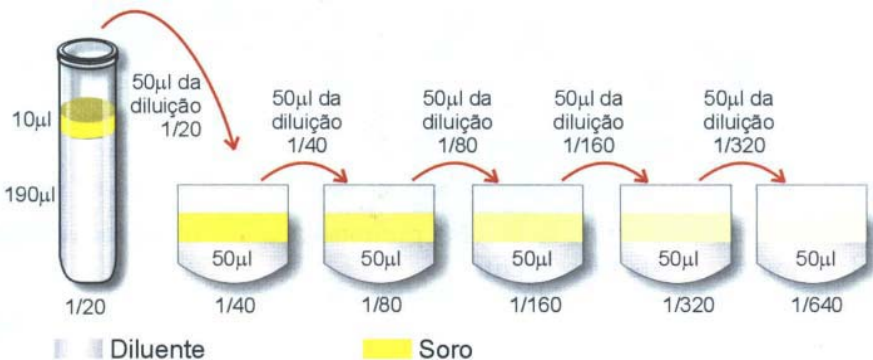


Figura 4 - Exemplo de diluição seriada da amostra para o teste de HAI quantitativo

Atenção: é preciso homogeneizar cada diluição antes de fazer a seguinte.



Depois de diluir, é preciso determinar o título da amostra.

Como é determinado o título de uma amostra no teste de HAI?

Para determinar o título você testa cada uma das diluições da amostra em um poço da placa de microtitulação. O **título** corresponde à última diluição em que a amostra ainda foi reagente, desde que a diluição seguinte tenha um resultado negativo ou indeterminado.

Continuando o exemplo do item anterior, veja, na Figura 5, o resultado obtido com cada uma das diluições da amostra:

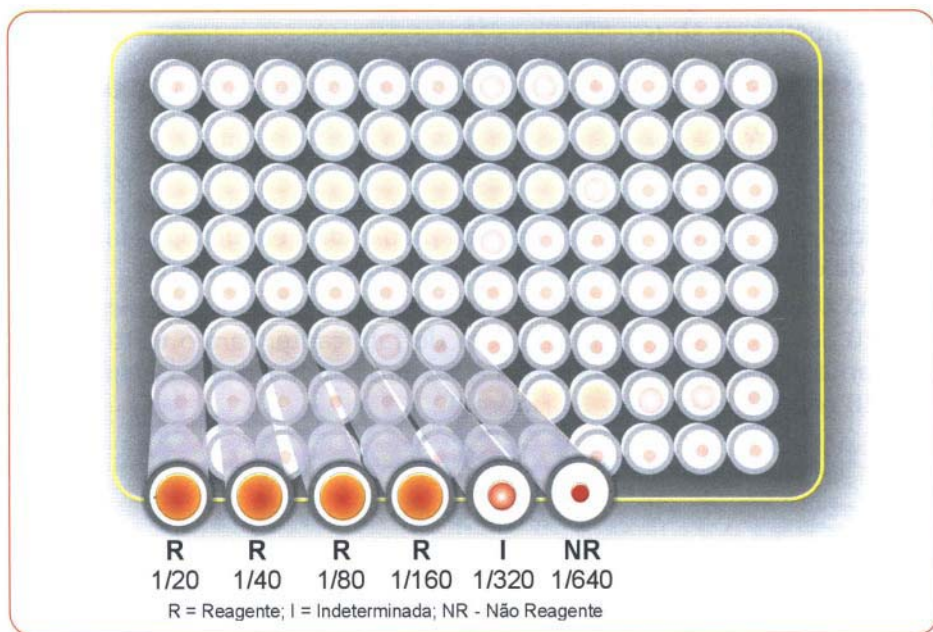


Figura 5 - Representação das reações de cada uma das diluições da amostra no HAI

Observe que o título foi de 160, porque a diluição 1/160 foi a última onde a amostra ainda foi reagente.

Quais os materiais necessários para realizar o teste de HAI qualitativo ou quantitativo?

No Quadro 2 estão os materiais geralmente fornecidos pelo fabricante e os materiais necessários mas não fornecidos.

Quadro 2 - Materiais utilizados para execução do teste de HAI

MATERIAIS GERALMENTE FORNECIDOS PELO FABRICANTE
✓ placas de microtitulação com fundo em V ou e U
✓ diluente para os soros ou plasmas
✓ soro-controle negativo
✓ soro-controle positivo
✓ hemácias sensibilizadas com antígeno <i>T. cruzi</i>
✓ 2 mecarptoetanol (2-ME)
Atenção: o 2-ME é recomendado por alguns fabricantes e incluído no conjunto diagnóstico. Essa substância quando misturada ao soro elimina a reatividade inespecífica diminuindo a possibilidade de se obter resultados falso-positivos e indeterminados .
MATERIAIS NÃO FORNECIDOS PELO FABRICANTE
✓ pipetas manuais de volume ajustável (de 5 a 50µl, de 50 a 200µl e de 200 a 1.000µl)
✓ ponteiros descartáveis para as pipetas de volume ajustável
✓ pipetas graduadas de 1ml, 5ml e 10 ml e pêra de borracha
✓ soro-controle positivo (CP) e negativo (CN) – produzido em seu próprio laboratório
✓ fita adesiva transparente para selar a placa
✓ espelho para leitura de placas de microtitulação (opcional)
✓ agitador de placas (opcional)
✓ protocolo de trabalho (vide bloco "Anexos")
✓ equipamentos de proteção individual: luvas, máscaras, avental ou jaleco
✓ recipiente de paredes rígidas, boca larga e tampa contendo hipoclorito de sódio a 2%

Siga as orientações do fabricante para conservar e armazenar os reagentes.



Como realizar um teste de HAI qualitativo e quantitativo ou para titulação?

O teste de HAI, qualitativo ou quantitativo (titulação), deve ser realizado de acordo com as orientações do fabricante. No entanto, alguns procedimentos gerais devem ser observados:

1. confira o conjunto diagnóstico (componentes, materiais, diluente e reagentes) verificando se ele está sob condições adequadas de conservação e dentro do prazo de validade;

Atenção: homogeneíze as hemácias sensibilizadas com o antígeno verificando se estão sem grumos. Se você observar a presença de grumos significa que houve autoaglutinação das hemácias o que torna o antígeno impróprio para uso.

2. leia todas as instruções do conjunto diagnóstico antes de iniciar o teste;
3. providencie os outros materiais, não fornecidos pelo fabricante, necessários para a realização dos testes;

Separe uma ponteira descartável para cada amostra e para cada tipo de reagente a ser pipetado. Não reutilize ponteiras.

4. utilize exatamente os volumes indicados para o preparo de todas as soluções. Não faça qualquer alteração com o intuito de economizar reagentes;
5. deixe as amostras e os reagentes que serão utilizados atingirem a temperatura ambiente, antes de iniciar a reação;

A temperatura ambiente em laboratórios deve estar entre **20°C e 26°C**.

6. inclua soros-controle positivo e negativo fornecidos pelo fabricante e produzidos em seu laboratório;
7. faça um protocolo de trabalho, relacionando os controles, as amostras e as diluições correspondentes. Veja um exemplo de protocolo de HAI no Anexo 1 deste manual;
8. faça a diluição das amostras: a) para o HAI qualitativo a amostra deve ser diluída em tubo, de acordo com a recomendação do fabricante, e depois pipetada na placa de microtitulação; b) para o HAI quantitativo a diluição seriada da amostra deve ser feita na razão 2, e a partir da diluição do HAI qualitativo. Faça cada uma das diluições diretamente em um poço da placa de microtitulação, de acordo com as instruções do fabricante;



Lembre-se: homogeneíze o conteúdo de cada diluição da amostra antes de fazer a diluição seguinte. Utilize uma ponteira para cada diluição.

Atenção: se o conjunto diagnóstico utilizar 2-ME, antes das diluições, as amostras deverão ser preparadas do seguinte modo:

- ▼ dilua o 2-ME 1/100 em salina. Por exemplo: 10 µl de 2-ME + 990 µl de solução 0,85% NaCl (cloreto de sódio isotônico, ou seja, "soro fisiológico");
- ▼ dilua cada amostra (soro puro) com 2-ME já diluído. Faça essa diluição em volumes iguais, por exemplo: para diluir 0,1 ml de soro utilize 0,1 ml de 2-ME já diluído;
- ▼ incube por 30 minutos a 37°C. É fundamental que o tempo de incubação seja **exatamente** 30 minutos.

9. homogeneize suavemente o antígeno e pipete em cada poço da placa de microtitulação o volume indicado pelo fabricante;
10. cubra a placa com fita adesiva transparente de modo que fique totalmente vedada;
11. agite, suavemente, a placa de microtitulação, de preferência com o agitador de placa, para homogeneizar todos os componentes;
12. incube a placa à temperatura ambiente, em local sem vibrações, pelo tempo recomendado pelo fabricante;
13. faça a leitura da reação verificando se os resultados obtidos para os controles estão de acordo com os critérios definidos pelo fabricante. Se os resultados dos controles não estiverem de acordo, inicie novamente o teste. Só considere os resultados das amostras quando os resultados dos controles estiverem de acordo com os critérios;
14. registre os resultados no protocolo;
15. despreze as amostras e os resíduos do conjunto diagnóstico utilizado, conforme as orientações do curso TELELAB - "Biossegurança em Unidades Hemoterápicas e em Laboratórios de Saúde Pública".

- ▼ Jamais inicie a execução dos testes antes de arrumar sua bancada de trabalho com todos os materiais e equipamentos necessários.
- ▼ Utilize sempre equipamentos de proteção individual e manipule as amostras como material potencialmente infectante.



Que medidas devem ser levadas em consideração para que você possa garantir a qualidade dos resultados do teste de HAI?

1. Leia atentamente todas as instruções do fabricante antes de iniciar qualquer reação;
2. providencie todo o material necessário à execução do teste e que não está contido no conjunto diagnóstico;
3. não misture controles, placas de microtitulação, hemácias sensibilizadas com antígeno e diluentes de diferentes lotes e/ou fabricantes;
4. homogeneize as hemácias observando se não houve aglutinação espontânea, antes de iniciar a reação;

Lembre-se: as hemácias autoaglutinadas formam grumos que as tornam impróprias para uso;

5. verifique se os reagentes apresentam turvação, precipitação ou alteração de cor, o que os torna impróprios para uso;

Não use reagentes com prazo de validade vencido;

6. execute as diluições da amostra em diluente específico fornecido no conjunto diagnóstico e de acordo com as orientações do fabricante;

Lembre-se que é fundamental homogeneizar cada diluição antes de fazer a seguinte e trocar a ponteira;

7. incube a placa de microtitulação em local sem vibrações.



Teste de imunofluorescência indireta - IFI



Em que se baseia a reação de Imunofluorescência indireta (IFI)?

A reação de IFI baseia-se na interação do próprio *T. cruzi* (formas epimastigotas) com os anticorpos contra esse parasita presentes no soro. Veja na Figura 6.

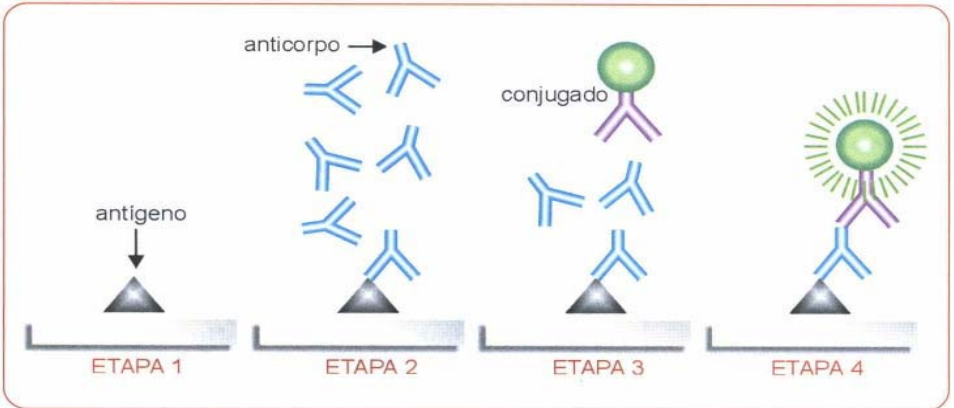


Figura 6 - Representação esquemática da reação de IFI positiva

Observe que:

- ▼ na **etapa 1**, o próprio parasita *T. cruzi* é fixado numa lâmina de vidro com regiões demarcadas;
- ▼ na **etapa 2**, é adicionada a amostra diluída que, sendo reagente, contém anticorpos específicos que se ligam ao antígeno *T. cruzi*;
- ▼ na **etapa 3**, adiciona-se o conjugado composto de uma anti-imunoglobulina humana ligada ao isotiocianato de fluoresceína, que servirá como revelador da reação antígeno e anticorpo;
- ▼ na **etapa 4**, a interação antígeno/anticorpo é evidenciada por meio da fluorescência do parasita.

Assim como o HAI, o teste de IFI também pode ser qualitativo ou quantitativo:

- **IFI qualitativo:** define se a amostra é reagente, não reagente ou indeterminada,
- **IFI quantitativo:** confirma os resultados das amostras reagentes e indeterminadas no IFI qualitativo e define o título das amostras reagentes.



Como é feita a leitura da reação e quais os critérios para se considerar uma amostra reagente, não reagente ou indeterminada no teste de IFI?

Para leitura da reação, é necessário que você utilize microscópio de fluorescência. A interpretação dos resultados deve obedecer aos critérios descritos no Quadro 3

Quadro 3 - Interpretação de uma reação de IFI para diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*

Amostra reagente	Presença de fluorescência uniforme em toda a membrana dos tripanossomas
Amostra não reagente	Ausência total de fluorescência nos tripanossomas que se apresentam, geralmente, com coloração vermelho tijolo
Amostra indeterminada	Qualquer padrão diferente dos descritos anteriormente. Geralmente, os tripanossomas apresentam fluorescência inespecífica, ou seja, em várias partes

O teste de IFI pode ser qualitativo ou quantitativo.

Como são feitas as diluições da amostra para realizar o teste de IFI qualitativo e quantitativo?

As diluições da amostra são feitas com **PBS** (Phosphate-Buffered-Saline), ou seja, solução salina tamponada com fosfatos, também chamada **tampão fosfato**.

Veja orientações para preparar o PBS no bloco "Fórmulas" deste manual.

Para o teste de IFI, as diluições são realizadas de acordo com as orientações definidas pela prática dos laboratórios de referência, ou seja:

- ▼ para o teste de **IFI qualitativo** recomenda-se a **diluição 1/20**, na triagem sorológica de doadores em **unidades hemoterápicas**, enquanto que para o diagnóstico nos **laboratórios de saúde pública** essa diluição deve ser de **1/40**;
- ▼ para o teste de **IFI quantitativo** recomenda-se a execução de pelo **menos 5 diluições na razão 2 a partir da diluição** do teste qualitativo.



Na Figura 7, você pode conferir a seqüência de diluições da amostra para IFI quando for necessária a titulação na triagem sorológica de doadores de sangue.

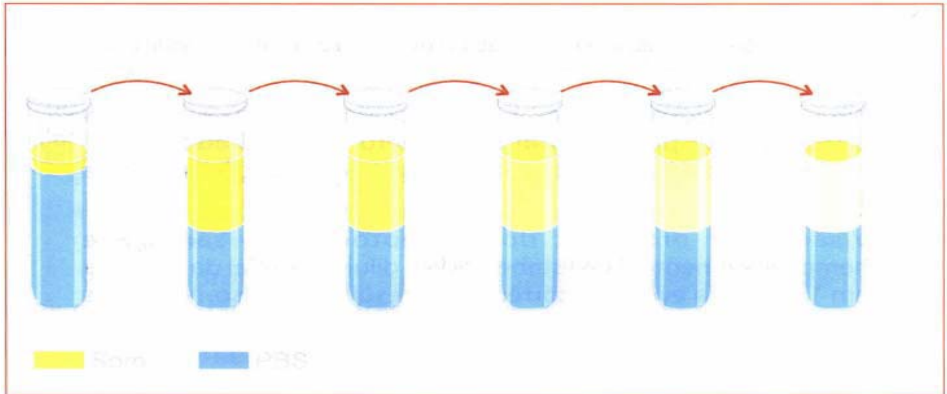


Figura 7 - Representação da seqüência de diluições da amostra no teste IFI quantitativo para triagem sorológica de doadores de sangue

Agora, veja na Figura 8, a seqüência de diluições da amostra no IFI quantitativo para diagnóstico sorológico.

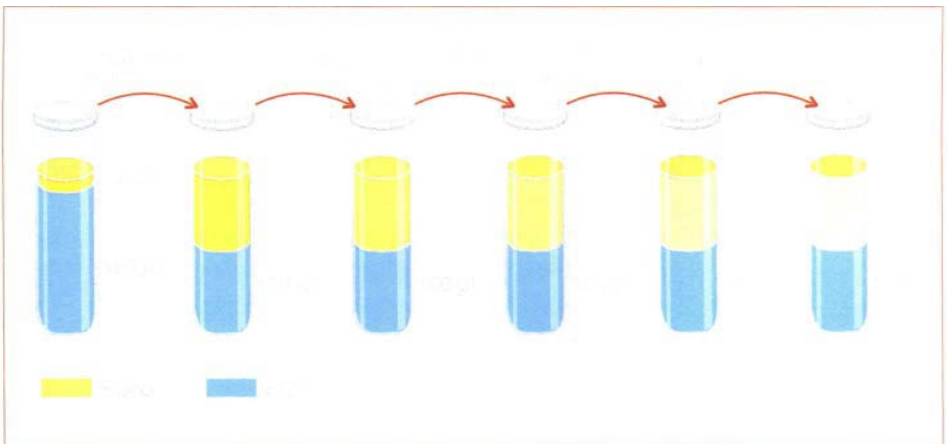


Figura 8 - Representação da seqüência de diluições no teste IFI quantitativo para diagnóstico sorológico

A opção dos laboratórios de referência pela diluição inicial da amostra em 1/40 para diagnóstico sorológico foi feita após estudos epidemiológicos. Esses estudos demonstraram que soros de indivíduos verdadeiramente chagásicos apresentam reatividade em diluição igual ou maior do que 1/40.

Os mesmos dados epidemiológicos indicaram que, na **população não-chagásica**, a presença de anticorpos naturais é responsável por um grande número de resultados falso-positivos, quando esses soros são testados em diluições menores do que 1/20.

Visando a proteção dos receptores de sangue e hemocomponentes, foi estabelecida a diluição inicial da amostra em 1/20, para evitar a ocorrência de resultados falso-negativos na triagem sorológica de doadores de sangue.

Como é determinado o título de uma amostra no teste de IFI?

Para determinar o título, cada uma das diluições da amostra é colocada em contato com o antígeno, em uma demarcação da lâmina de IFI. O título como você já sabe, corresponde à última diluição em que a amostra ainda foi reagente, desde que a diluição seguinte tenha um resultado negativo ou indeterminado.



Na reação de IFI o conjugado também precisa ser titulado.

Por que é necessário titular o conjugado na reação de IFI?

O título do conjugado varia em função das condições de trabalho e do operador. Além disso, existem variações tanto na qualidade dos reagentes de cada lote quanto na capacidade de resolução dos diferentes microscópios de fluorescência. Portanto, mesmo que o fabricante indique o título, a titulação deve ser feita:

- ▼ a cada novo lote de conjugado ou de antígeno;
- ▼ sempre que o controle positivo acusar perda de intensidade de fluorescência.

Veja, no próximo item, quais os materiais necessários para titular o conjugado e testar as amostras por IFI.

Quais os materiais necessários para realizar o teste de IFI?

Para o teste de IFI, o antígeno e os reagentes são adquiridos separadamente ou juntos em um conjunto diagnóstico.

No Quadro 4, na página seguinte, estão relacionados os materiais necessários para execução do teste de IFI.



Quadro 4: materiais necessários para execução do teste de IFI**REAGENTES**

- ✓ Antígeno de *T cruzi* (fixado na lâmina, liofilizado ou em suspensão)
Atenção: os antígenos liofilizados e em suspensão devem ser preparados e fixados nas lâminas seguindo rigorosamente as instruções do fabricante.
- ✓ Tampão fosfato PBS (phosphate buffer saline) pH 7,2 – vide bloco "Fórmulas"
- ✓ Azul de Evans (AE) (vide bloco "Fórmulas")
- ✓ Conjugado anti-imunoglobulina humana (total ou IgG) conjugada ao isotiocianato de fluoresceína
- ✓ Glicerina tamponada pH (9,0± 0,5) – vide bloco "Fórmulas"
- ✓ Soros-controle (positivo e negativo) – controle de qualidade interno da reação, conforme orientações do curso TELELAB – "Controle de Qualidade de Testes Sorológicos em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública"

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS DE LABORATÓRIO

- ✓ Relógio despertador (timer)
- ✓ Lâminas demarcadas para IFI
- ✓ Microscópio de fluorescência
- ✓ Pipetas manuais de volume ajustável (5 µl a 50 µl, 50µl a 200 µl, 200 µl a 1.000 µl)
- ✓ Ponteiras descartáveis para as pipetas manuais
- ✓ Balança semi-analítica e acessórios de pesagem
- ✓ Agitador tipo Kline (opcional)
- ✓ Estufa com temperatura regulável a **37°C**
- ✓ Câmara úmida
- ✓ Cubas para lavagem de lâminas (cuba de Koplín)
- ✓ Lamínulas 24 x 50 mm
- ✓ Provetas de 1.000 ml
- ✓ Béquer de 2.000 ml
- ✓ Recipientes de paredes rígidas, boca larga e tampa contendo hipoclorito de sódio a 2%
- ✓ Luvas descartáveis, óculos, máscaras ou protetor facial e jaleco
- ✓ Protocolo de trabalho (vide bloco "Anexos")

Como armazenar os reagentes do teste de IFI?

As lâminas já contendo o antígeno fixado devem ser armazenadas a **- 20°C**. Aqueles laboratórios que utilizam antígeno liofilizado ou em suspensão devem conservá-los entre **2°C** e **8°C**, antes de fazer a fixação na lâmina.

A anti-imunoglobulina humana (total ou IgG), glicerina tamponada e azul de Evans, devem ser mantidos também entre **2°C** e **8°C**.



Veja no curso TELELAB - "Controle de Qualidade de Testes Sorológicos em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública", como armazenar e conservar os soros-controle.

Agora que você já conhece os materiais e a forma de armazená-los, veja no próximo item como titular o conjugado.

Como realizar a titulação do conjugado?

A titulação do conjugado deve ser feita do seguinte modo:

1. leia atentamente todas as instruções do fabricante;
2. deixe o soro-controle negativo, o positivo e os demais reagentes atingirem a temperatura ambiente. Utilize um soro positivo com título entre 80 e 320;
3. deixe uma lâmina com o antígeno já fixado atingir a temperatura ambiente;

Evite atrito na parte superior da lâmina para **não** remover o antígeno fixado

4. coloque a lâmina em estufa a 37°C até sua completa secagem.

Cuidado: a lâmina não pode ficar na estufa além de 10 minutos, que é o tempo máximo necessário para essa secagem;

5. faça a identificação da lâmina e prepare um protocolo de trabalho, indicando as posições do soro controle positivo (CP), do negativo (CN) e do PBS. Veja na Figura 9.



Figura 9 -Representação de uma lâmina para titulação do conjugado

Atenção: a demarcação contendo **PBS** é um controle para verificar se o conjugado reage inespecificamente com os parasitas. Se houver fluorescência no PBS o procedimento precisa ser realizado novamente.



6. faça e homogeneíze a diluição do soro CN a 1/20 (190 µl de PBS + 10 µl do CN);
7. faça a diluição com PBS do CP, de acordo com o título do soro que você estiver utilizando (1/80, 1/160 ou 1/320);
8. pipete nas demarcações correspondentes da lâmina: 10 µl do PBS, 10 µl do CN já diluído e 10 µl do CP já diluído;
Lembre-se: providencie uma ponteira descartável para cada tipo de controle e reagente a ser pipetado. Não reutilize ponteiras.
9. coloque a lâmina em câmara úmida e incube em estufa a 37°C por 30 minutos;
10. faça a lavagem da lâmina, após a incubação, do seguinte modo:
 - a) mergulhe-a, rapidamente, em um recipiente contendo PBS pH 7,2;
 - b) coloque a lâmina na cuba e adicione PBS pH 7,2 até cobri-la completamente;
 - c) coloque a cuba em agitação durante 5 minutos. Caso você não tenha um agitador tipo Kline, faça sucessivas e cuidadosas agitações manuais pelo mesmo espaço de tempo;
 - d) repita os passos b e c mais 2 vezes, trocando o PBS a cada vez;
 - e) lave rapidamente a lâmina em água destilada;
 - f) coloque-a em estufa a **37°C** até a completa secagem.
Lembre-se: a lâmina não pode ficar na estufa além de 10 minutos.

Enquanto aguarda a agitação e a secagem da lâmina, você pode executar os passos 11 e 12.

11. prepare a solução PBS e Azul de Evans (AE) a 0,01%, para diluir o conjugado, seguindo as orientações do bloco "Fórmulas" deste manual;
12. faça as diluições do conjugado como apresentado na Figura 10.



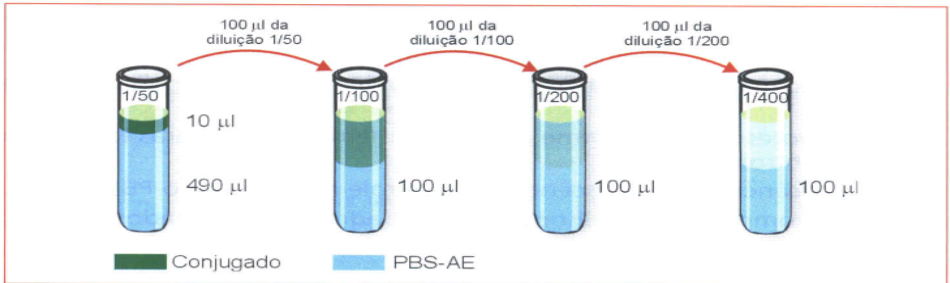


Figura 10 - Diluições recomendadas para titular o conjugado

Atenção: é fundamental homogeneizar cada tubo antes de fazer a diluição seguinte e trocar a ponteira.

13. pipete 10 µl de cada diluição do conjugado nas demarcações correspondentes da lâmina. Confira na Figura 11.

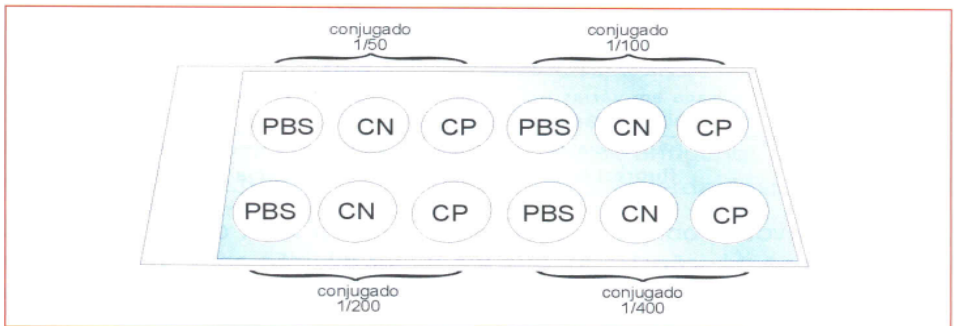


Figura 11 - Lâmina com o PBS e soro positivo e negativo já diluídos para a titulação do conjugado

14. faça a incubação e a lavagem da lâmina seguindo os mesmos procedimentos descritos nos passos 9 e 10;
15. prepare a lâmina para leitura aplicando 2 a 3 gotas de glicerina tamponada pH 9,0 ($\pm 0,5$) sobre a mesma;
16. cubra a lâmina com uma lamínula 24 x 50 mm evitando a formação de bolhas. Mantenha a lâmina ao abrigo da luz e em local seco até a leitura;
17. faça a leitura da reação da lâmina em microscópio de fluorescência, utilizando objetiva de 40 vezes;
18. registre os resultados no protocolo.



Como interpretar os resultados para determinar o título ideal do conjugado?

Considera-se como título ideal do conjugado a maior diluição que apresentar:

- ▼ fluorescência uniforme em toda a membrana do parasita no soro controle positivo;
- ▼ ausência de fluorescência no controle negativo e no PBS.

Para compreender melhor, veja, no Quadro 5, os resultados obtidos, para cada diluição do conjugado.

Quadro 5 - Exemplo 1 - resultados obtidos na titulação do conjugado

Diluição do Conjugado	RESULTADOS		
	C P	C N	P B S
1/50	Fluorescência uniforme em toda a membrana do parasita	fluorescência descontínua na membrana do parasita	ausência de fluorescência
1/100	Fluorescência uniforme em toda a membrana do parasita	ausência de fluorescência	ausência de fluorescência
1/200	fluorescência inespecífica ou fraca em várias partes do parasita	ausência de fluorescência	ausência de fluorescência
1/400	ausência de fluorescência	ausência de fluorescência	ausência de fluorescência

Como você pode ver, no exemplo, o título ideal do conjugado foi encontrado na diluição 1/100, que é a maior diluição onde foi observada fluorescência uniforme na membrana do parasita no controle positivo, sem fluorescência no controle negativo e no PBS.

Veja, agora, no Quadro 6 um outro exemplo.



Quadro 6 - Exemplo 2 - resultados obtidos na titulação do conjugado

Diluição do Conjugado	RESULTADOS		
	C P	C N	P B S
1/50	fluorescência uniforme em toda a membrana do parasita	fluorescência descontínua na membrana do parasita	ausência de fluorescência
1/100	fluorescência uniforme em toda a membrana do parasita	fluorescência descontínua na membrana do parasita	ausência de fluorescência
1/200	fluorescência uniforme em toda a membrana do parasita	ausência de fluorescência	ausência de fluorescência
1/400	fluorescência uniforme em toda a membrana do parasita	ausência de fluorescência	ausência de fluorescência

Observe que, no exemplo 2, não foi encontrado o título ideal e, neste caso, você deve repetir os procedimentos de titulação com mais duas diluições do conjugado (1/800 e 1/1600).

É preciso repetir os procedimentos até que o título ideal do conjugado seja encontrado para que você possa testar as amostras.

Lembre-se que você deve titular o conjugado:

- ▼ a cada novo lote do conjugado ou de antígeno;
- ▼ sempre que o controle positivo acusar perda de intensidade de fluorescência.



Como realizar o teste de IFI qualitativo e quantitativo (titulação)?

1. Leia as instruções do fabricante de cada reagente antes de iniciar o teste;
2. deixe os soros-controle e as amostras atingirem a temperatura ambiente. Inclua o controle de qualidade interno, conforme orientações do curso TELELAB – "Controle de Qualidade de Testes Sorológicos em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública";
3. deixe o conjugado, a glicerina tamponada e o azul de Evans atingirem a temperatura ambiente;
4. faça o protocolo de trabalho. Você encontra um exemplo desse protocolo no Anexo 2 deste manual;
5. retire do congelador o número de lâminas correspondente à quantidade de amostras a serem testadas e deixe-as descongelar até atingirem a temperatura ambiente;

Atenção: as lâminas já devem estar com o antígeno fixado.

6. coloque essas lâminas em estufa a 37°C até a sua completa secagem (no máximo 10 minutos);
7. faça em PBS a diluição das amostras:
 - a) para o teste de IFI qualitativo:
 - ▼ faça a diluição a 1/20 nas **unidades hemoterápicas**;
 - ▼ faça a diluição a 1/40 nos **laboratórios de saúde pública**.
 - b) para o teste de IFI **quantitativo (titulação)**, as diluições da amostra devem ser feitas na razão 2 a partir da diluição do IFI qualitativo, seguindo as orientações já apresentadas;

Lembre-se: homogeneíze o conteúdo de cada diluição da amostra antes de fazer a diluição seguinte.

8. pipete, em cada demarcação da lâmina, 10µl das diluições dos soros controles (CP e CN) e das amostras, de acordo com o seu protocolo de trabalho;
9. coloque as lâminas em câmara úmida e incube-as em estufa a 37°C durante 30 minutos;
10. faça a lavagem das lâminas, após a incubação, seguindo os mesmos procedimentos descritos na titulação do conjugado;



11. dilua o conjugado de acordo com a titulação já realizada, enquanto aguarda o tempo de incubação das amostras. Calcule o volume do conjugado a ser diluído de acordo com o número de amostras a serem testadas. Em geral, 150 μl são suficientes para testar cada lâmina;

- ▼ Prepare somente o volume de PBS-AE a 0,01% necessário para diluir o conjugado.
- ▼ Jamais utilize o conjugado diluído de um dia para outro.

12. pipete 10 μl do conjugado diluído em cada demarcação da lâmina;
13. faça a incubação e a lavagem das lâminas seguindo os mesmos procedimentos já descritos nos passos 9 e 10;
14. prepare as lâminas para leitura aplicando 2 a 3 gotas de glicerina tamponada pH 9,0 ($\pm 0,5$) sobre cada lâmina;
15. cubra cada lâmina com uma lamínula de 24 x 50 mm, evitando a formação de bolhas. Mantenha as lâminas ao abrigo da luz e em local seco até a leitura;
16. faça a leitura da reação em microscópio de fluorescência, utilizando objetiva de 40 vezes. Inicie a leitura pela demarcação que corresponde ao controle positivo; em seguida, leia a demarcação que corresponde ao controle negativo; e, finalmente, leia as demarcações correspondentes às amostras;

Atenção: os controles devem apresentar padrão reagente (CP) e não reagente (CN). Caso contrário, descarte a lâmina e repita o teste a partir do primeiro passo, procurando identificar e corrigir as causas dos resultados inadequados. Só considere os resultados das amostras quando os resultados dos controles estiverem de acordo com os critérios do fabricante.

17. registre os resultados no protocolo;
18. despreze as amostras, a sobra do conjugado e os resíduos dos reagentes utilizados, conforme as orientações do curso TELELAB - "Biossegurança em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública".

Jamais inicie a execução dos testes antes de arrumar sua bancada de trabalho com todos os materiais e equipamentos necessários.



Que medidas devem ser levadas em consideração para que você possa garantir a qualidade dos resultados do IFI?

1. Leia atentamente todas as instruções do fabricante antes de iniciar qualquer reação;
2. providencie todo o material necessário à execução do teste;
3. homogeneize cada diluição antes de fazer a seguinte e troque a ponteira,
4. verifique se os reagentes apresentam turvação, precipitação ou alteração de cor, o que os torna impróprios para uso. Não use reagentes com prazo de validade vencido;
5. faça a titulação do conjugado a cada novo lote do conjugado e do antígeno e sempre que o controle positivo acusar perda de reatividade;
6. não utilize o conjugado diluído de um dia para o outro;
7. verifique as condições de funcionamento do microscópio.



Teste de ELISA

TESTE DE ELISA



Em que se baseia o ELISA?

O ELISA é um teste imunoenzimático que se baseia na interação antígeno-anticorpo evidenciada pela ação de uma enzima e o substrato apropriado, e revelada por um cromógeno.

Cromógeno - substância que revela a ação de uma enzima sobre o substrato por meio de mudança de cor.

São componentes do ELISA: fase sólida, antígeno, enzima, substrato, cromógeno e solução de bloqueio da reação.

Fase sólida: material capaz de adsorver o antígeno ou o anticorpo que será empregado no teste.

Quais as variações encontradas nos componentes do ELISA para o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*?

Confira, no Quadro 7, as variações encontradas nos componentes do ELISA para o diagnóstico da doença de Chagas.

Quadro 7 -Variações encontradas nos componentes do ELISA

COMPONENTES	ELISA
Fase Sólida	<ul style="list-style-type: none"> • placas de microtitulação - produzidas, geralmente, em poliestireno transparente com 96 cavidades ou em tiras (strips) de 8 ou 12 cavidades, com fundo chato ou arredondado • pérolas - pequenas esferas de poliestireno
Antígeno	<ul style="list-style-type: none"> • frações isoladas do parasita <i>T. Cruzi</i>, preparadas para produzir a possibilidade de reação cruzada
Enzima	<ul style="list-style-type: none"> • fosfatase alcalina ou • peroxidase
Substrato	<ul style="list-style-type: none"> • peróxido de hidrogênio (H₂O₂)
Cromógenos	<ul style="list-style-type: none"> • ortofenilenodiamina (OPD) ou • tetrametil benzidina (TMB).
Solução de bloqueio	<ul style="list-style-type: none"> • H₂SO₄ ou • HCL



Qual o tipo de ELISA utilizado no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*?

Para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* utiliza-se o ELISA **indireto**.

Qual a seqüência de um ELISA indireto?

A Figura 12 apresenta a seqüência de um ELISA indireto para uma amostra reigente:

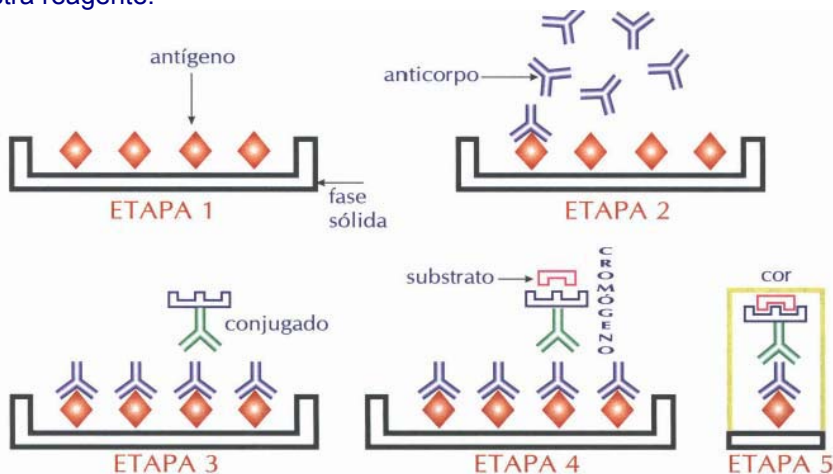


Figura 12 - Seqüência esquemática de um ELISA indireto para uma amostra reigente. Observe que:

- ▼ na **etapa 1**, os antígenos estão adsorvidos à fase sólida;
- ▼ na **etapa 2**, é adicionada a amostra que, sendo reigente, contém anticorpos específicos que se ligam à fase sólida;
- ▼ na **etapa 3**, com a adição de um conjugado, composto de uma enzima ligada a um **anti-anticorpo** (anti-imunoglobulina), ocorre a interação conjugado e anticorpo da amostra;
- ▼ na **etapa 4**, adicionam-se o substrato e o cromógeno;

- ▼ na **etapa 5**, a ação da enzima no substrato é revelada pelo cromógeno, que sofre um processo de oxidação dando origem a um produto com **cor** na amostra **reagente**. A cor varia de acordo com o tipo de cromógeno utilizado. Nesta etapa, é adicionada uma solução de bloqueio para interromper o processo de oxidação. Se esse processo não for interrompido haverá aparecimento de cor em todas as amostras levando a resultados falso-positivos.

Atenção: se **não** houver anticorpo específico na amostra, ou seja, se ela for **não reagente**, a reação **não** acontecerá e conseqüentemente **não** haverá desenvolvimento de cor.

A cor resultante da ação da enzima deve ser lida em espectrofotômetro.

Como definir se um resultado de ELISA é reagente, não reagente ou indeterminado?

No ELISA o resultado de uma reação é definido pela leitura da absorbância ou densidade ótica (DO) em espectrofotômetro, utilizando um filtro com comprimento de onda indicado pelo fabricante do conjunto diagnóstico. Usualmente, cada conjunto tem sua forma de calcular o ponto de corte (*cut-off*-CO), acima ou abaixo do qual as amostras são consideradas reagentes, não reagentes ou indeterminadas.

As amostras indeterminadas são aquelas cujos valores de DO estão incluídos na zona cinza (*borderline*). A zona cinza compreende a faixa de valores em torno do *cut-off*, dentro da qual não se pode ter certeza do resultado.

Como definir a zona cinza no ELISA?

Em geral, o fabricante do conjunto diagnóstico indica como definir a zona cinza.

Quando não existir a orientação do fabricante, recomenda-se que sejam consideradas indeterminadas as amostras com valores de DO incluídas no intervalo de 10% a 20% abaixo ou acima do valor do *cut-off*.

Acompanhe um exemplo do cálculo do intervalo de 10% para definição da zona cinza:

ELISA com CO = 0,20

10% do CO = 0,20 / 10 = 0,02

Limite inferior da zona cinza = CO - 10% = 0,20 - 0,02 = 0,18

Limite superior da zona cinza = CO + 10% = 0,20 + 0,02 = 0,22

Neste exemplo, são consideradas indeterminadas as amostras com DO de **0,18 a 0,22**.



Quais os materiais utilizados para execução do ELISA?

No Quadro 8 estão os materiais geralmente fornecidos pelo fabricante e os materiais não fornecidos.

Quadro 8 -Materiais utilizados para execução do ELISA

MATERIAIS GERALMENTE FORNECIDOS PELO FABRICANTE	
✓	placa de microtitulação ou pérolas sensibilizadas com antígeno <i>T. cruzi</i>
✓	selos ou tampas de cobertura
✓	soro-controle negativo
✓	soro-controle positivo
✓	soluções-tampão para a diluição das amostras e do conjugado
✓	solução-tampão para a lavagem
✓	conjugado
✓	substrato e cromógeno
✓	solução-tampão para diluir o substrato
✓	solução de bloqueio de reação
MATERIAIS NÃO FORNECIDOS PELO FABRICANTE	
✓	relógio (timer)
✓	pipetas manuais de volume ajustável (de 5 a 50 µl, de 50 a 200 µl e de 200 a 1.000 µl) mono e multicanal
✓	ponteiras para pipetas manuais de volume ajustável
✓	pipetas graduadas de 5 ml e 10 ml
✓	pêra de borracha ou outro auxiliar de pipetagem
✓	barquetes (reservatórios) para a utilização de pipetas multicanal
✓	béquer de 1.000 ml
✓	provetas de 100 ml, 500 ml e 1.000 ml
✓	frasco com tampa de 1.000 ml
✓	bastão de vidro
✓	equipamentos de proteção individual: luvas, máscaras, avental ou jaleco
✓	recipiente de paredes rígidas, boca larga e tampa contendo hipoclorito de sódio a 2%
✓	protocolo de trabalho (vide bloco "Anexos")

Siga as orientações do fabricante, para conservar e armazenar os reagentes.

Além dos materiais constantes do Quadro 8, o laboratório deve estar equipado com banho-marfa com termostato para regulagem de temperatura; estufa com termostato regulável; sistema de lavagem e de leitura compatíveis com os métodos empregados e com as especificações dos conjuntos diagnósticos disponíveis.

Antes de iniciar um procedimento, verifique se os equipamentos estão em condições adequadas de uso. No curso TELELAB - "Equipamentos - Utilização e Monitoramento em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública" você encontra as orientações necessárias.



Quais os procedimentos para executar o ELISA ?

Os procedimentos variam de acordo com o fabricante do conjunto diagnóstico. Alguns procedimentos gerais, no entanto, devem ser observados:

1. confira o conjunto diagnóstico, verificando todos os seus componentes, se eles estão sob condições adequadas de conservação e dentro do prazo de validade;
2. leia todas as instruções do conjunto diagnóstico antes de iniciar a reação;
3. providencie os outros materiais, não fornecidos pelo fabricante, necessários para a realização dos testes;

Atenção: providencie uma ponteira descartável para cada amostra e para cada tipo de reagente a ser pipetado. Não reutilize ponteiras.

4. utilize exatamente os volumes indicados para preparar as soluções, não faça qualquer alteração com o intuito de economizar reagentes;
5. deixe as amostras e os reagentes que serão utilizados atingirem a temperatura ambiente, antes de iniciar a reação;

A temperatura ambiente em laboratórios deve estar entre **20°C e 26°C**.

6. homogeneize as amostras;
7. inclua, além dos controles fornecidos pelo fabricante, o controle de qualidade interno da reação, conforme orientações do curso TELELAB - "Controle de Qualidade de Testes Sorológicos em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública";
8. faça um protocolo de trabalho, relacionando os controles e as amostras. Veja um exemplo de um protocolo de ELISA no Anexo 3 deste manual;
9. siga rigorosamente os tempos de incubação e os ciclos de lavagem indicados pelo fabricante, tendo o cuidado de evitar a contaminação cruzada das amostras;
10. faça a leitura da absorbância em espectrofotômetro, utilizando o filtro recomendado pelo fabricante;

Siga as orientações do fabricante do conjunto diagnóstico para o cálculo do *cut-off*.

11. verifique se os resultados obtidos para os controles estão de acordo com os critérios definidos pelo fabricante. Caso contrário, faça novamente o teste procurando identificar e corrigir as causas dos resultados inadequados. Só considere os resultados das amostras quando os resultados dos controles estiverem de acordo com os critérios do fabricante;
12. registre os resultados no protocolo;



13. despreze as amostras e os resíduos do conjunto diagnóstico utilizado, conforme as orientações do curso TELELAB - "Biossegurança em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública".

- ▼ Jamais inicie a execução dos testes antes de arrumar sua bancada de trabalho com todos os materiais e equipamentos necessários.
- ▼ Utilize sempre equipamentos de proteção individual e manipule as amostras como material potencialmente infectante.

Que medidas devem ser levadas em consideração para que você possa garantir a qualidade dos resultados do ELISA?

- ▼ Verifique se os reagentes apresentam turvação, precipitação ou alteração de cor, o que os torna impróprios para uso. Não use reagentes com prazo de validade vencido;
- ▼ não misture controles, conjugados, pérolas ou placas de diferentes lotes e/ou fabricantes;
- ▼ armazene os conjuntos diagnósticos de acordo com as recomendações do fabricante;
- ▼ não exponha o substrato à luz durante o armazenamento ou incubação da reação, evitando assim a fotodecomposição do mesmo;
- ▼ não coloque o substrato em contato com substâncias oxidantes ou metais, para evitar sua degradação, evidenciada pela alteração de cor;
- ▼ faça a limpeza e a manutenção periódica dos equipamentos de lavagem, evitando dessa maneira o acúmulo de sais e outros compostos químicos;
- ▼ verifique se o filtro usado para a leitura da absorbância é aquele indicado pelo fabricante.



Triagem sorológica de doadores de sangue e diagnóstico sorológico da doença de chagas



TRIAGEM SOROLÓGICA DE DOADORES DE SANGUE E
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Infecção pelo T. cruzi

Triagem sorológica de doadores de sangue em unidades hemoterápicas

Que tipo de amostra deve ser utilizada?

O soro é a amostra mais indicada para detecção de anticorpos anti-T *cruzi*. Veja informações sobre a preparação das amostras no manual "Coleta de Sangue" do TELELAB.

As amostras **não** podem estar turvas, lipêmicas ou hemolisadas. Em qualquer desses casos elas devem ser descartadas e novas amostras devem ser solicitadas.

Atenção: a experiência de alguns pesquisadores tem demonstrado que quando se utiliza plasma nos testes sorológicos, ele deve ser centrifugado para separar e retirar a fibrina. A testagem do plasma contendo fibrina pode levar a resultados tanto falso-positivos quanto falso-negativos.

Como registrar a entrada das amostras para a triagem sorológica de doadores de sangue?

O registro pode ser feito por sistema manual ou informatizado.

De qualquer modo, é importante que você:

- ▼ copie, do rótulo da amostra, e registre na planilha de resultados os dados de identificação do doador e a data da coleta.

Os dados devem sempre ser conferidos por duas pessoas. Erros de identificação podem:

- ▼ expor o receptor a riscos de contaminação;
- ▼ levar à rejeição de um doador apto.



Em quantas alíquotas devem ser distribuídas as amostras, antes dos testes para a triagem sorológica de doadores de sangue?

Antes da testagem, as amostras de soro devem, **obrigatoriamente**, ser distribuídas em, no mínimo, duas alíquotas:

- ▼ uma para os testes de rotina; e
- ▼ outra para a contraprova.

Recomenda-se que a alíquota da contraprova tenha um volume de aproximadamente 1 ml.

A alíquota da contraprova deve ficar armazenada obrigatoriamente a **- 20 °C** e estar disponível por seis meses para a Vigilância Sanitária.

A distribuição em um número maior de alíquotas e o volume das mesmas fica a critério de cada serviço.

Como acondicionar e conservar as alíquotas, antes de fazer os testes para a triagem sorológica de doadores de sangue ?

- ▼ Distribua as alíquotas para os testes de **rotina**, em tubos ou frascos com tampa e **previamente identificados** com os dados correspondentes;

Atenção: as alíquotas das amostras podem ser conservadas em geladeira, entre **2 °C** e **8 °C** por **72 horas** no máximo. Depois desse período, elas precisam ser congeladas a **- 20 °C**.

- ▼ distribua em frascos próprios para congelamento a alíquota da contraprova e demais alíquotas a serem congeladas;
- ▼ acondicione esses frascos em caixas de papelão ou plástico rígido identificadas com informações que facilitem a localização dessas alíquotas.



Como é feita a triagem sorológica de doadores de sangue para a doença de Chagas?

Nas unidades hemoterápicas, a triagem sorológica de doadores de sangue é obrigatória e visa a **proteção do receptor** e não o diagnóstico da doença de Chagas.

Veja, na Figura 13, o fluxograma recomendado para a realização dessa triagem.



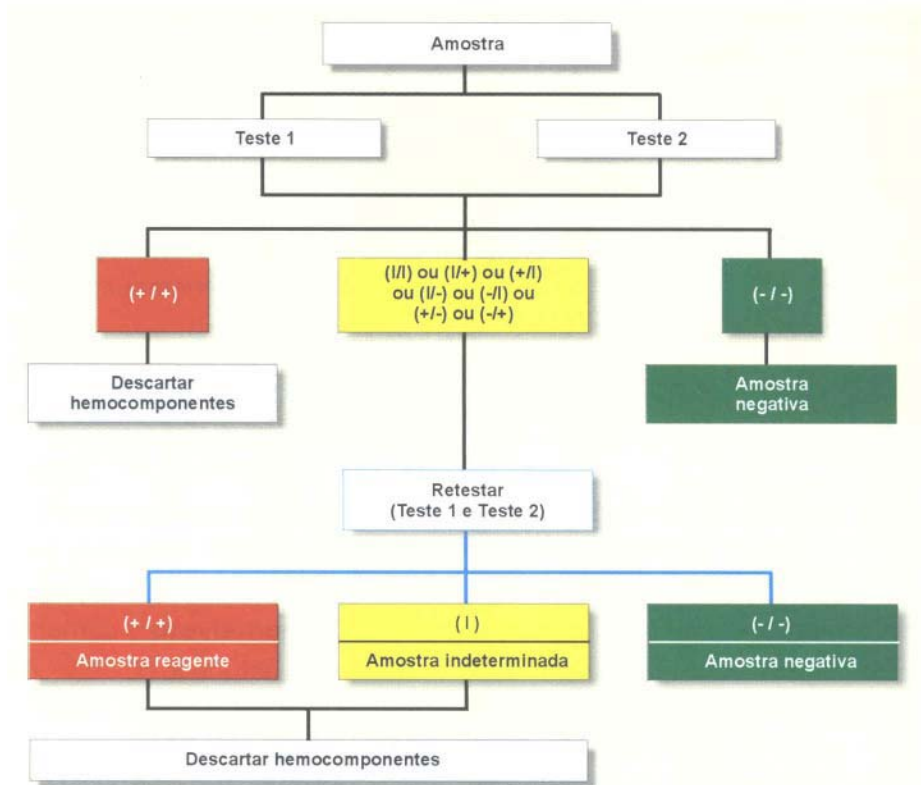


Figura 13 - Fluxograma de triagem sorológica de doadores de sangue para a infecção pelo *T. cruzi*

Para a compreensão deste fluxograma, é importante observar que:

■ **nos testes 1 e 2:**

- ▼ a amostra deve ser testada **simultaneamente** em dois testes (1 e 2) de princípios metodológicos diferentes, escolhidos de acordo com as condições do serviço: ELISA e HAI, ELISA e IFI ou HAI e IFI. O HAI e o IFI devem ser executados de modo **qualitativo**. Recomenda-se o ELISA como uma das escolhas, sempre que possível;

- ▼ **a amostra reagente** nos dois testes tem seu resultado definido como "amostra reagente" para a infecção pelo *T. cruzi*;
- ▼ **a amostra não reagente** nos dois testes tem seu resultado definido como "amostra negativa" para a infecção pelo *T. cruzi*;
- ▼ **a amostra indeterminada** ou com **resultados discordantes** deve ser retestada com a repetição dos Testes 1 e 2, sendo que:
 - para o ELISA deve ser feita repetição em duplicata e com o mesmo conjunto diagnóstico;
 - para o HAI deve ser feita a titulação (teste quantitativo) com o mesmo conjunto diagnóstico utilizado na HAI qualitativa;
 - para o IFI deve ser feita a titulação (teste quantitativo) com os mesmos reagentes utilizados na IFI qualitativa.
- **na retestagem:**
 - ▼ **a amostra reagente** nos dois testes tem seu resultado definido como "amostra reagente" para a infecção pelo *T. cruzi*;
 - ▼ **a amostra não reagente** nos dois testes tem seu resultado definido como "amostra negativa" para a infecção pelo *T. cruzi*;
 - ▼ **a amostra indeterminada** ou com **resultados discordantes** é definida como "**amostra indeterminada**" para a infecção pelo *T. cruzi*;
 - ▼ **a definição do resultado de cada amostra** testada de acordo com este fluxograma deve obedecer aos critérios apresentados no Quadro 9.

Quadro 9 – Critérios para definição do resultado final da triagem sorológica de doadores de sangue para a doença de Chagas		
Resultados do Teste 1 e Teste 2	Resultados da retestagem em duplicata	Resultado da triagem
(- / -)		negativa
(+ / +)		reagente
(+ / -) ou (- / +) ou (+ / I) ou (I / +) ou (I / -) ou (- / I) ou (I / I)	(- / -)	negativa
	(+ / +)	reagente
	(+ / -) ou (- / +) ou (+ / I) ou (I / +) ou (I / -) ou (- / I) ou (I / I)	indeterminada

(-) não reagentes; (+) reagentes; (I) indeterminada



Atenção: a liberação dos hemocomponentes só pode ser feita quando todos os testes sorológicos obrigatórios apresentarem resultados negativos, conforme normas vigentes do Ministério da Saúde.

Quais os procedimentos com os doadores que apresentarem resultados reagentes ou indeterminados?

Os doadores com resultados reagentes ou indeterminados para a infecção pelo *T. cruzi* devem ser encaminhados aos serviços médicos para diagnóstico.

As unidades hemoterápicas devem notificar os casos reagentes para a infecção pelo *T. cruzi* junto à vigilância epidemiológica local.



Infecção pelo T. cruzi

Diagnóstico sorológico em laboratórios de saúde pública

Como registrar a entrada das amostras em laboratórios de saúde pública?

O registro pode ser feito por sistema manual ou informatizado. De qualquer modo, é importante que você:

- 1) verifique se a identificação no rótulo da amostra é a mesma da solicitação do(s) teste(s);
- 2) copie da solicitação e registre numa planilha de resultados os seguintes itens básicos:
 - ▼ número de registro da amostra;
 - ▼ nome;
 - ▼ procedência da amostra (unidade que solicitou);
 - ▼ data da coleta;
 - ▼ sexo;
 - ▼ idade.

Atenção: os dados devem sempre ser conferidos por duas pessoas. Erros de identificação **podem levar à troca de resultados.**

É preciso distribuir em alíquotas as amostras para análises nos laboratórios de saúde pública?

Nos **laboratórios de saúde pública não** existe a obrigatoriedade da alíquota para contraprova. No entanto, recomenda-se que a amostra seja distribuída no mínimo em duas alíquotas:

- ▼ uma para realizar os testes solicitados;
- ▼ outra para atender necessidades relacionadas, por exemplo, à execução de testes complementares.

Para acondicionar e armazenar as amostras utilize os mesmos procedimentos já apresentados para as amostras da triagem sorológica.



Como é feito o diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. cruzi* em laboratórios de saúde pública ?

Veja, na Figura 14, o fluxograma para o diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. cruzi* em laboratórios de saúde pública.

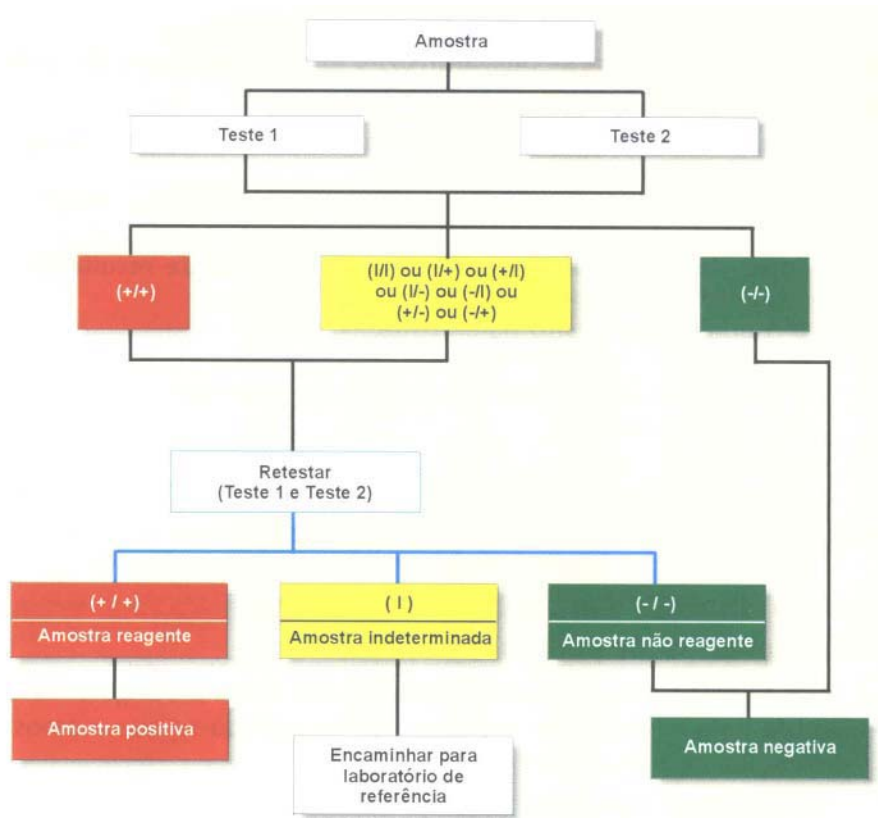


Figura 14 – Fluxograma para diagnóstico sorológico da infecção pelo *T cruzi*



Para a compreensão do fluxograma do diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. cruzi*, é importante observar que:

■ **no Teste 1 e 2:**

- ▼ a amostra deve ser testada em dois testes (1 e 2) de princípios metodológicos diferentes escolhidos de acordo com a disponibilidade do serviço: ELISA e HAI, ELISA e IFI ou HAI e IFI. Recomenda-se o ELISA como uma das escolhas, sempre que possível;
- ▼ **a amostra não reagente** nos dois testes tem seu resultado definido como "**amostra negativa**" para a infecção pelo *T. cruzi*;
- ▼ **a amostra reagente, indeterminada** ou com **resultados discordantes** deve ser **retestada** através da repetição dos Testes 1 e 2, sendo que:
 - para o ELISA deve ser feita repetição em duplicata e com o mesmo conjunto diagnóstico;
 - para o HAI deve ser feita a titulação (teste quantitativo) com o mesmo conjunto diagnóstico utilizado na HAI qualitativa;
 - para o IFI deve ser feita a titulação (teste quantitativo) com os mesmos reagentes utilizados na IFI qualitativa.

■ **na retestagem:**

- ▼ **a amostra não reagente** nos dois testes tem seu resultado definido como "**amostra negativa**" para a infecção pelo *T. cruzi*;

Atenção:

Em caso de amostras reagentes na testagem inicial (Teste 1 e Teste 2) e não reagentes na retestagem **não** libere nenhum dos resultados obtidos com as outras amostras testadas no **mesmo protocolo**. Isto porque é possível que tenha havido erro de transcrição no protocolo ou troca de amostras. Se o protocolo estiver correto, **faça** novamente o teste de **todas as amostras** seguindo o fluxograma.

- ▼ **a amostra reagente** nos dois testes tem seu resultado definido como "**amostra positiva**" para a infecção pelo *T. cruzi*;
- ▼ **a amostra indeterminada** ou com **resultados discordantes** deve ser encaminhada a um laboratório de referência. Veja na próxima página.



Para encaminhar amostras indeterminadas ou com resultados discordantes na retestagem, faça contato com o seguinte laboratório:

Laboratório de Referência Nacional para Diagnóstico Sorológico da
Doença de Chagas - Laboratório de Sorologia Instituto
Octávio Magalhães - Fundação Ezequiel Dias
Rua Conde Pereira Carneiro, 80 – Gameleira
CEP 30510-010 Belo Horizonte
Fax: (031) 371-9474

Atenção: no manual "Coleta de Sangue" do TELELAB você encontra orientações sobre o acondicionamento das amostras para transporte.

O laboratório de saúde pública deve notificar os casos positivos para a infecção pelo *T. cruzi* à vigilância epidemiológica local.



Fórmulas

FÓRMULAS



Tampão fosfato (PBS pH 7,2)

■ materiais necessários:

- ✓ balança semi-analítica;
- ✓ papel de pesagem;
- ✓ béquer de 1.000 ml;
- ✓ 1 espátula;
- ✓ 1 bastão de vidro (ou agitador magnético e barra magnética);
- ✓ pHmetro (medidor de pH).

■ fórmula:

COMPONENTES	QUANTIDADE
Cloreto de sódio (NaCl) P.A. - (MM 58)	8,77 g
Fosfato de sódio dibásico anidro (Na ₂ HPO ₄) P. A. (MM	1,02 g
Fosfato de sódio monobásico anidro (NaH ₂ PO ₄) P.A.	0,34 g
Água destilada (q.s.p.) (MM 18)	1.000 ml

P. A. = Para Análise; MM = massa molecular, também conhecida como peso molecular; q.s.p. = quantidade suficiente para

■ preparo:

- ▼ pese cada sal separadamente e transfira para o béquer. Veja instruções para pesagem no curso TELELAB – "Equipamentos - Utilização e Monitoramento em Unidades Hemoterápicas e Laboratórios de Saúde Pública"
- ▼ adicione água destilada em **quantidade suficiente para (q.s.p.)** completar o volume de 1.000 ml;
- ▼ misture tudo até a completa dissolução dos sais. Utilize o agitador magnético ou um bastão;
- ▼ verifique, com auxílio do pHmetro, se o pH da solução encontra-se na seguinte faixa: **pH 7,2 ± 0,2**. Caso não esteja, prepare nova solução.

Atenção: para preparar o PBS com sais hidratados, as quantidades devem ser recalculadas em função das moléculas de água presentes. Verifique sempre no rótulo dos produtos a composição e a massa molecular dos sais.



■ **cálculo do peso de sais hidratados:**

Para a correção do peso de qualquer sal hidratado, é preciso fazer uma regra de três. Veja um exemplo:

- ▼ se para utilizar Na_2HPO_4 (sal anidro) com MM 142 é preciso pesar 1,02 g
- ▼ para utilizar $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (sal hidratado) com MM 359, quanto é preciso pesar?
- ▼ MM 142 está para 1,02 g, assim como MM 359 está para x g

$$\frac{142}{359} = \frac{1,02}{x}$$

$$x = \frac{359 \times 1,02}{142}$$

$$x = 2,57 \text{ g}$$

Neste exemplo, onde o fosfato de sódio dibásico hidratado contém 12 moléculas de água, deve-se, portanto, pesar 2,57 g para preparar o PBS pH 7,2.

Lembre-se: antes de pesar qualquer sal, verifique sempre na embalagem sua composição a sua massa molecular.

Solução de Azul de Evans a 0,1 % (estoque)

Azul de Evans..... 100 mg
PBS q.s.p 100 ml

Conservar em geladeira.



Solução PBS-AE a 0,01 %

1. Coloque em um tubo 100 μ l da solução de Azul de Evans a 0,1% e 900 μ l de PBS pH 7,2. Você vai obter um volume final de 1 ml PBS/AE que, em geral, é suficiente para as diluições necessárias do conjugado;
2. homogeneize suavemente a solução para evitar a formação de bolhas.

Prepare a solução PBS-AE a 0,01% imediatamente antes da diluição do conjugado. Lembre-se que todo corante é degradado pela ação da luz.

Glicerina tamponada

A) solução de carbonato de sódio a 0,5 M

Carbonato de sódio anidro (CO_3Na_2) 5,3 g
 H_2O destilada 100 ml

B) solução de bicarbonato de sódio a 0,5 M

Bicarbonato de sódio (CO_3HNa) 4,2 g
 H_2O destilada 100 ml

C) solução tampão carbonato-bicarbonato (0,5 M) pH 9.5

Coloque em um recipiente de vidro 10 ml da solução **A** + 13 ml da solução **B**. Homogeneizar e medir o pH.

Fórmula da glicerina tamponada

Glicerina P.A 9 partes
 Solução **C** 1 parte

Atenção: descarte as soluções ao primeiro sinal de contaminação.



Anexos

ANEXOS



ANEXO 1

EXEMPLO DE PROTOCOLO DE HAI PARA DOENÇA DE CHAGAS

TESTE DE HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA (HAI)

Protocolo nº _____
 Fabricante: _____ Lote: _____
 Técnico responsável: _____

Data: __/__/__
 Validade: __/__/__

Identificação das amostras e resultados da leitura

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Identificação												
	Resultado												
B	Identificação												
	Resultado												
C	Identificação												
	Resultado												
D	Identificação												
	Resultado												
E	Identificação												
	Resultado												
F	Identificação												
	Resultado												
G	Identificação												
	Resultado												
H	Identificação												
	Resultado												

Observações: _____



ANEXO 2**EXEMPLO DE PROTOCOLO DE TESTE DE
IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (IFI) PARA DOENÇA DE CHAGAS**

IFI nº: _____ Data: _/ _/ _
 Antígeno: _____ Lote: _____ Validade: _/ _/ _
 Conjugado: _____ Lote: _____ Validade: _/ _/ _ Diluição: _____
 Técnico responsável: _____

Resultados**Identificação**

Lâmina nº: _____

1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12

- | | |
|----------------------|-----------|
| 1. Controle Positivo | 7. _____ |
| 2. Controle Negativo | 8. _____ |
| 3. _____ | 9. _____ |
| 4. _____ | 10. _____ |
| 5. _____ | 11. _____ |
| 6. _____ | 12. _____ |

Lâmina nº: _____

1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12

- | | |
|----------------------|-----------|
| 1. Controle Positivo | 7. _____ |
| 2. Controle Negativo | 8. _____ |
| 3. _____ | 9. _____ |
| 4. _____ | 10. _____ |
| 5. _____ | 11. _____ |
| 6. _____ | 12. _____ |

Lâmina nº: _____

1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12

- | | |
|----------------------|-----------|
| 1. Controle Positivo | 7. _____ |
| 2. Controle Negativo | 8. _____ |
| 3. _____ | 9. _____ |
| 4. _____ | 10. _____ |
| 5. _____ | 11. _____ |
| 6. _____ | 12. _____ |

Observações: _____



ANEXO 3

EXEMPLO DE PROTOCOLO DE ELISA PARA DOENÇA DE CHAGAS

Protocolo nº: _____ Data: ___/___/___
 Fabricante: _____ Lote: _____ Validade: ___/___/___
 Técnico responsável: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Observações: Ponto de Corte ("cut-off"): _____



Bibliografia



- CAMARGO, M.E. & TAKEDA, G.K.F. Diagnóstico de laboratório. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Brener, Z. & Andrade, Z. (organizadores), Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1979, pp 175-198.
- FERREIRA, A. W. & AVILA, S. L.M. Sorologia: Importância e parâmetros. In: Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes. Ferreira, A.V. & Ávila, S.L.M. (organizadores), Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996, pp. 1-6.
- GOMES, Y. M. Diagnóstico etiológico. In: Doença de Chagas. Malta, J.A. (organizador). Editora Sarvier, São Paulo, 1996, pp. 119-132.
- GOMES, Y. M. PCR and sero-diagnosis of chronic Chagas' disease: biotechnological advances. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 66:107-119, 1997.
- GUIMARÃES, M. C. S. Exames de laboratório: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 18 117-120, 1985.
- LUQUETTI, A. O. & CASTRO A. M. Diagnóstico sorológico da doença de Chagas. In: Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Dias, J. C. P. & Coura, J. R. (organizadores). Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 1997, pp. 99-113.
- LUQUETTI, A. O. Use of *Trypanosoma cruzi* defined proteins for diagnosis – multicentre trial serological and technical aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85 : 497-505, 1990.
- LUQUETTI, A. O. Megaesôfago e anticorpos *anti-Trypanosoma cruzi*. *Rev Goiana Med.* 331-16, 1987.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria 1.376. Normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados. Brasília, novembro de 1993.
- MONCAYO, A. & LUQUETTI, A. O. Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85 : 489-495, 1990.
- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. Manual de Procedimientos de Control de Calidad para los Laboratorios de Serologia de los Bancos de Sangre. CURA, E. & WENDEL, S. (organizadores) ed. OPS, Washington, 1994, pp 61.
- SÁEZ-ALQUÉZAR, A. *et al.* Estudo multicêntrico: avaliação do desempenho de conjuntos diagnósticos de hemaglutinação indireta, disponíveis no Brasil, para o diagnóstico sorológico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Pat. Trop.*, 26 : 343-374, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas' disease. Report of a WHO Expert Committee, Geneva, 1991, pp. 38-43.



Agradecimentos:

Fundação Hemocentro de Brasília
Fundação Ezequiel Dias - MG
Fundação Hemocentro de Pernambuco - HEMOPE
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
Universidade Federal de Goiás

Agradecimento Especial:

Beatriz Mac Dowell Soares, José Antônio de Faria Vilaça e aos servidores da Fundação Hemocentro de Brasília, pelo apoio incondicional para a execução deste projeto.

Projeto gráfico, arte-final e impressão:



(061) 347-4125



Ministério da Saúde
Secretaria de Políticas de Saúde
Coordenação Nacional de DST e Aids
Coordenação de Sangue e Hemoderivados

