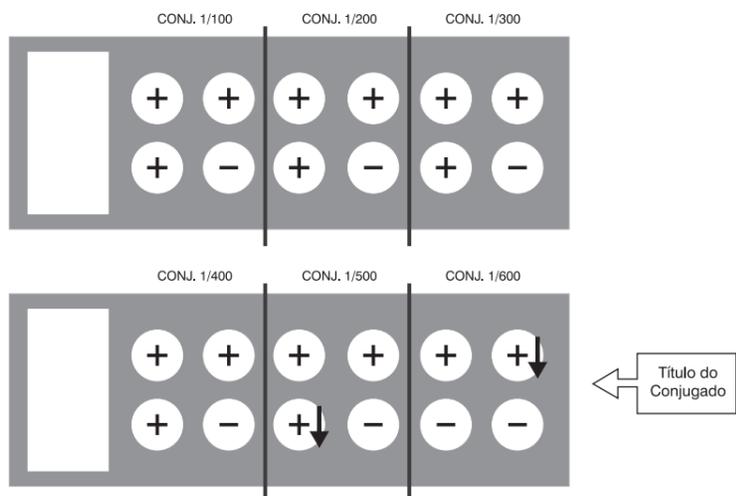


- CN (dil. 1:40) Ausência de fluorescência em todos os parasitas
 CP (dil. 1:160) Presença de fluorescência de boa intensidade
 CP (dil. 1:320) Presença de fluorescência de fraca intensidade
 CP (dil. 1:640) Ausência de fluorescência, conforme CN (dil. 1:40)



+↓= positivo fraco
 * título determinado em 1/600.

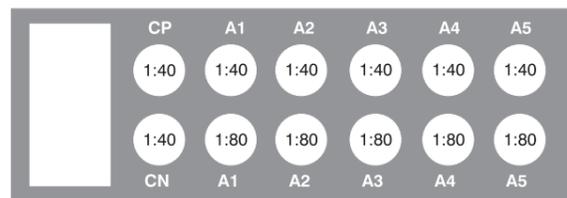
PROCEDIMENTO DO TESTE:

1- Limpar as lâminas e laminulas previamente;

Obs. 1: as amostras teste devem ser submetidas ao ensaio de imunofluorescência pelo menos nas diluições 1:40 e 1:80.

Obs. 2: os soros controles positivo e negativo, diluídos 1:40, devem estar presentes em todas as lâminas para comparações no momento da leitura.

2- Fazer o protocolo de trabalho para determinar o número de lâminas a serem preparadas, considerando o número de amostras e suas diluições (1:40 e 1:80).



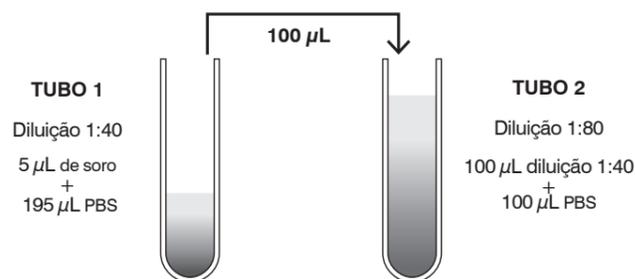
3- Adicionar 10 µL do antígeno em cada orifício da lâmina, tendo o cuidado de mantê-lo homogeneizado durante o preparo. Deixar secar por 60 minutos à 37 ± 1 °C, em estufa ou "overnight" à temperatura de 15 à 30 °C ; Obsevar se houve uma boa fixação dos parasitas.

ATENÇÃO: evitar atrito com a parte superior da lâmina onde encontram-se os parasitas fixados.

4- Diluir os soros controles positivo e negativo 1:40 em PBS. Para realizar esta diluição utilizar 5 mL dos controles e adicionar 195mL de PBS.

OBS: Os soros controles só devem ser manipulados no momento de sua utilização e em seguida retornar à sua temperatura de conservação (2 à 8 °C).

5- Diluir as amostras (1:40 e 1:80) conforme o esquema abaixo.



6- Adicionar 10 µL das diluições de soro por orifício, conforme o protocolo previamente elaborado. Deve-se tomar cuidado para que as amostras não se misturem durante a incubação.

7- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos à 37 °C ± 1 °C.

8- Lavar as lâminas 3 (três) vezes em PBS, em cubas de lavagem apropriadas por 5 minutos cada lavagem.

9- Lavar rapidamente as lâminas, uma vez, em água destilada ou de qualidade superior.

10- Colocar as lâminas por 10 minutos a 37 °C ± 1 °C para secar.

ATENÇÃO: Não exceder esse tempo.

11- Preparar, momentos antes do uso, uma solução PBS-AE, conforme tabela a seguir:

Título	PBS	AE	PBS+AE
1:100	480 µL	20 µL	500 µL
1:200	960 µL	40 µL	1000 µL
1:300	1440 µL	60 µL	1500 µL
1:400	1920 µL	80 µL	2000 µL
1:500	2400 µL	100 µL	2500 µL
1:600	2880 µL	120 µL	3000 µL
1:700	3360 µL	140 µL	3500 µL
1:800	3840 µL	160 µL	4000 µL
1:900	4320 µL	180 µL	4500 µL

12- Diluir o conjugado na proporção adequada, conforme titulação prévia. Adicionar 15 µL da diluição do conjugado em cada orifício das lâminas.

Título	Conjugado	PBS+AE	PBS+AE+Conjugado	Nº Lâminas
1:100	5 µL	495 µL	500 µL	1 à 2
1:200	5 µL	995 µL	1000 µL	1 à 5
1:300	5 µL	1495 µL	1500 µL	1 à 8
1:400	5 µL	1995 µL	2000 µL	1 à 11
1:500	5 µL	2495 µL	2500 µL	1 à 12
1:600	5 µL	2995 µL	3000 µL	1 à 12
1:700	5 µL	3495 µL	3500 µL	1 à 12
1:800	5 µL	3995 µL	4000 µL	1 à 12
1:900	5 µL	4495 µL	4500 µL	1 à 12

OBS: O conjugado só deve ser manipulado no momento de sua utilização e em seguida retornar à sua temperatura de conservação (2 à 8 °C).

Obs. 1: diluir somente a quantidade de conjugado necessária para utilização no mesmo dia.

Obs. 2: evitar pipetar menos de 5 µL de conjugado para minimizar a possibilidade de erros na diluição.

13- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos a 37 °C ± 1 °C

14- Lavar as lâminas 3 (três) vezes em PBS, em cubas de lavagem apropriadas, por 5 minutos cada lavagem.

15- Lavar rapidamente as lâminas, uma vez, em água destilada ou de qualidade superior.

16- Colocar as lâminas por 10 minutos 37 °C ± 1 °C, em estufa, para secar.

OBS: Observar se as lâminas estão totalmente secas. Caso necessário deixá-las na estufa até que estejam totalmente secas. Tomar o cuidado para não exceder muito o tempo.

18- Adicionar 1 gota de glicerina tamponada sobre cada orifício da lâmina, cobrindo-a com a laminula. Manter as lâminas ao abrigo da luz e umidade, até o momento da leitura.

LEITURA E INTERPRETAÇÃO:

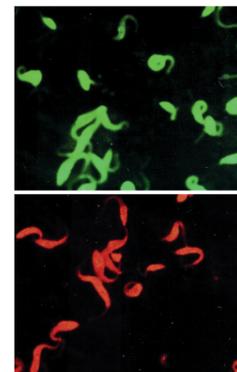
1- Para a leitura e interpretação das reações utilizar o microscópio de imunofluorescência e objetiva de 40X.

2- Focalizar o orifício do soro controle positivo e observar a fluorescência presente nos parasitas.

3- Focalizar o orifício do soro controle negativo e observar a ausência de fluorescência nos parasitas, bem como a coloração de fundo "background".

4- Focalizar os orifícios dos soros testes e considerar:

REAGENTE: Presença de fluorescência uniforme na membrana dos parasitos, a partir da diluição 1:40 e 1:80.



NÃO-REAGENTE: Ausência de fluorescência em todos os parasitas, nas diluições 1:40 e 1:80, conforme o poço do controle negativo (1:40).

INDETERMINADO: Presença de fluorescência em todos os parasitas na diluição 1:80 e ausência de fluorescência na diluição 1:40. Neste caso, recomendamos que a amostra seja submetida à repetição do teste para confirmação do resultado.

Qualquer padrão diferente dos descritos anteriormente. Neste caso, repita a reação e persistindo o resultado, submeta a amostra à outra metodologia.

ATENÇÃO: é recomendada a utilização de pelo menos duas metodologias, de princípios diferentes, para caracterização do diagnóstico laboratorial da Doença de Chagas, devendo-se ainda, considerar o diagnóstico clínico.

ÍNDICE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE:

Os kits IFI Chagas Bio-Manguinhos aprovados e comercializados possuem índices de sensibilidade e especificidade ≥ 90%.

ÍNDICE DE REPRODUTIBILIDADE, REPETITIVIDADE E ESTABILIDADE:

Diversos estudos foram realizados em nossos laboratórios utilizando amostras conhecidas e caracterizadas como padrão, sob os aspectos de reprodutibilidade e repetitividade. As conclusões nos permitiram determinar um período mínimo de 12 meses de validade para o produto, quando acondicionado conforme as recomendações do Manual de Instruções de Uso. Durante este período, o produto manteve suas características e seus padrões de qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Camargo, M. E. & Rebonato, C.; 1969. Cross-reactivity in immunofluorescence for Trypanosoma and Leishmania antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg.; 18: 500-505.
 2. Camargo, M. E. ; Taakeda, G. K. F.; 1979. Diagnóstico de laboratório. Brener Z., Andrade, Z. eds. Trypanosoma cruzi e Doença de chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 175 - 198.
 3. Zicker, F.; SMITH, P. G. et al.; 1990. Mass screening for Trypanosoma cruzi infections using the

immunofluorescence, ELISA and haemagglutination test s on serum samples and on blood eluates from filter-paper. Bull. World Health Organ. 68: 465-472.

4. Zauza P. L. 2000. Avaliação dos níveis de anticorpos (IgG) anti T. cruzi em soros de pacientes chagásicos crônicos de Virgem da Lapa. Minas Gerais, Brasil. Tese de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. p.132.

Registro MS 80142170020

Responsável técnico: Edimilson Domingos da Silva, CRBio-2 RJ/ES nº: 21433-02.

Fabricante Legal:

Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz
 Av. Brasil, 4365 – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ
 CNPJ 33.781.055/0001-35 – Indústria Brasileira

Unidade Fabril:

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos
 Av. Brasil, 4365 – Manguinhos – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro- RJ | CNPJ: 33.781.055/0015-30

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS:

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto a:

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/ Bio-Manguinhos | Fiocruz
 Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP: 21040-900 - Rio de Janeiro - RJ | CNPJ: 33.781.055/0001-35
 Indústria Brasileira | SAC: 08000.210.310 | sac.reativos@bio.fiocruz.br | www.bio.fiocruz.br

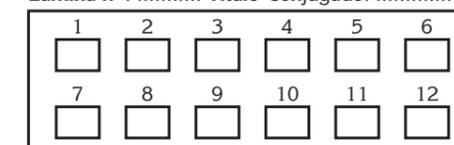
PROIBIDA VENDA AO COMÉRCIO

ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS MODELO DE PROTOCOLO

Produto: Lote nº: Validade:/.....

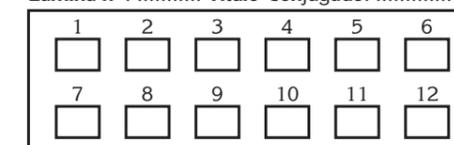
Início: h min Término: h min

Lâmina nº: Título Conjugado:



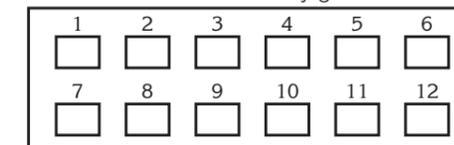
- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12

Lâmina nº: Título Conjugado:



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

Lâmina nº: Título Conjugado:



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

Conclusões:

Técnico responsável:

Observações:

Aprovação da Arte: agosto|2022 Arte: BM-BUL-020-05-R-52926 DI: ART0231_001MAN Texto: MI_IFI_CHAGAS_002 (TME0006_002MAN)

IFI CHAGAS
Bio-Manguinhos

IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI) PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS
 (material fornecido para 600 reações)

IFI CHAGAS Bio-Manguinhos

IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (IFI) PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS (material fornecido para 600 reações)

INDICAÇÃO DE USO:

O Kit IFI CHAGAS Bio-Manguinhos é utilizado na detecção de anticorpos contra o *T. cruzi* (agente causador da doença de Chagas), em soros ou plasmas humanos.

PRINCÍPIO DO TESTE:

O teste de imunofluorescência indireta consiste na reação de anticorpos presentes em soros ou plasmas humanos com parasitas (*T. cruzi*), fixados previamente em lâminas de microscopia. Numa etapa seguinte, utiliza-se um anticorpo anti-imunoglobulina humana (Ig) conjugada com isotiocianato de fluoresceína, para evidenciar a reação. A leitura é realizada com auxílio de microscópio que utiliza incidência de luz ultravioleta, sendo considerados reagentes os soros que apresentarem fluorescência e não reagentes os soros que apresentarem ausência de fluorescência, tomando-se como referência os soros controle positivo e negativo que devem ser incluídos em cada lâmina.

ESQUEMA DO TESTE:

Reagente



Não reagente



MATERIAL FORNECIDO:

Componentes	Apresentação
Suspensão de Antígeno	01 frasco com 6,0 mL
Controle Positivo	01 frasco com 0,3 mL
Controle Negativo	01 frasco com 0,3 mL
Conjugado Anti-Ig Humano / FITC	01 frasco com 0,3 mL
Glicerina Tamponada pH 9,0 ± 0,5	02 frascos com 5,0 mL
Azul de Evans 0,1%	01 frasco com 1,5 mL
Caixa com 50 lâminas	01 caixa
Caixa com 50 laminulas	01 caixa
Manual de Instrução de Uso	01 unidade

MATERIAL COMPLEMENTAR NÃO FORNECIDO:

- Tampão fosfato/salina (PBS) - pH 7,2;
- Tubos, pipetadores de volume regulável e ponteiros;
- Câmara úmida;
- Cubas para lavagem das lâminas (tipo Koplín);
- Luvas descartáveis;
- Água destilada;
- Hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária;
- Recipiente para descarte de material contaminado;
- Vidraria básica em geral (tubos, pipetas, provetas, etc);
- Estufa a 37± 1 °C;
- Microscópio para fluorescência.

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DOS COMPONENTES:

Manter entre 2 a 8 °C:

- Suspensão de Antígeno;
- Controle Positivo;
- Controle Negativo;
- Conjugado Anti-Ig Humano / FITC;
- Glicerina Tamponada pH 9,0 ±0,5;
- Azul de Evans 0,1%;
- Caixa com 50 lâminas;
- Caixa com 50 laminulas.

Todos os componentes do kit devem ser conservados nas temperaturas indicadas em seus rótulos, desde o ato do recebimento até a validade definida na caixa principal do kit.

Obs.: De acordo com estudos realizados em Bio-Manguinhos, a temperatura de transporte, com bobinas de gelo reciclável, permite que o conjunto se mantenha em condições estáveis durante 24 a 36 horas.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Somente para uso Diagnóstico *“in vitro”*.

Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos, podendo representar uma fonte de infecção. Portanto, ao manusear qualquer um dos reagentes desse conjunto, observe as precauções de biossegurança necessárias.

A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico, como a segurança dos operadores depende do cumprimento às boas práticas de laboratório, tais como:

- As amostras e os soros controles devem ser manipulados com cuidado;
- Em casos de acidente procure assistência médica;
- Insumos formulados com produtos químicos podem causar intoxicação e irritação, em casos de acidente procure assistência médica;
- Homogeneizar as amostras e soros controles antes de usar;
- Utilizar equipamento de proteção individual (EPI), tais como luvas descartáveis, jaleco e protetor facial, em todas as etapas do teste.
- Desprezar ponteiros, luvas, pipetas de vidro, frascos, placas utilizadas, etc., em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária;
- Nunca misturar componentes de lotes diferentes;
- Aconselha-se só utilizar componentes do mesmo lote.
- Para evitar interferências, nunca tocar com os dedos na parte superior das lâminas;
- Nunca reaproveitar as lâminas;
- Não usar os componentes do kit após sua data de validade;
- Utilizar frascos e vidrarias rigorosamente limpos, pois resíduos de detergentes e/ou substâncias oxidantes poderão interferir na reação;
- Utilizar lápis para identificação das lâminas.

PREPARO DO TAMPÃO FOSFATO pH 7,2 (PBS):

Sais	Quantidade
Cloreto de Sódio (NaCl) PA - 0,15M	8,77 g
Fosfato de Sódio Dibásico Anidro (Na2HPO4) PA - 0,0072M	1,02 g
Fosfato de Sódio Monobásico Anidro (NaH2PO4) PA - 0,0028M	0,34 g
Água destilada q.s.p. (quantidade suficiente para)	1000 mL

ATENÇÃO: os sais descritos acima, quando não utilizados na forma anidra, deverão ter suas quantidades recalculadas em função das moléculas de água presentes. Verifique sempre no rótulo dos produtos a composição dos sais e o peso molecular.

Exemplo de correção de peso para preparo de PBS quando se utiliza o fosfato dibásico hidratado com 12 moléculas de água.

Cálculo:

Na2HPO4 Anidro - Peso Molecular = 142

pesar 1,02 g

Na2HPO4.12H2O - Peso Molecular = 358

pesar X g

142 - 1,02 X = 1,02 x 358 = 2,57 g

358 - X 142

Neste exemplo, onde o Fosfato Dibásico é hidratado com 12 moléculas de água, devem-se pesar 2,57g para preparar o PBS.

TITULAÇÃO DO CONJUGADO:

O título do conjugado pode variar em função das condições de trabalho, do microscópio utilizado e do operador. O laboratório deverá repetir a titulação sempre que houver variação de temperatura, abertura de novo kit, troca de microscópio, lâmpada do microscópio ou quando observado a queda da intensidade da fluorescência do controle positivo ao longo do tempo.

1- Limpar as lâminas e laminulas previamente com lenço de papel ou gaze.

2- Sensibilizar 4 (quatro) lâmina, adicionando 10 µL do antígeno em cada orifício.

É INDISPENSÁVEL uma boa homogeneização da suspensão antigênica antes e durante a sensibilização.

3- Deixar secar por 60 minutos à 37 ± 1 °C, em estufa ou 12 a 16 horas à temperatura entre 23 – 28 °C;

Obsevar se o orifício apresenta uma turbidez indicando que houve uma boa fixação dos parasitas. Evitar atrito com a parte superior da lâmina onde se encontram os parasitas fixados.

4- Fazer um protocolo de trabalho, indicando a posição das diluições do Controle Positivo (CP), e do Controle Negativo (CN), conforme a seguir:

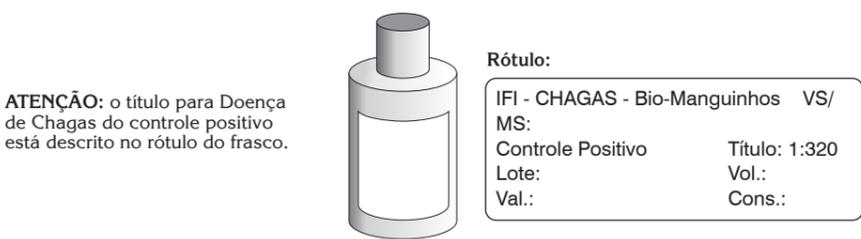
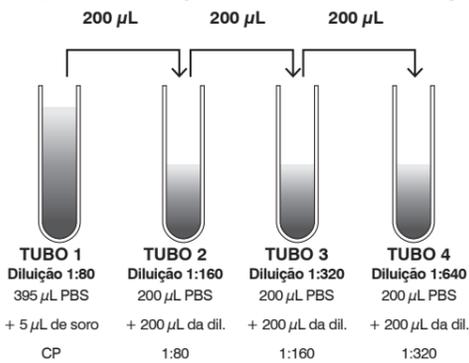
Lâmina 1	Lâmina 2

CP* título = Diluição referente ao título do soro controle positivo para Doença de Chagas.

5- Diluir o controle negativo (CN) 1:40 em PBS. Para realizar esta diluição, pipetar 5µL do controle negativo e adicionar 195 µL de PBS. Homogeneizar suavemente, evitando a formação de bolhas.

OBS: Os soros controles só devem ser manipulados no momento de sua utilização e em seguida retornar à sua temperatura de conservação (2 à 8 °C).

6- Diluir o controle positivo (CP) utilizando o esquema de diluição seriada a seguir:



ATENÇÃO: o título para Doença de Chagas do controle positivo está descrito no rótulo do frasco.

ATENÇÃO: Durante as diluições seriadas, homogeneizar o conteúdo de cada tubo antes de transferir o volume de 200 µL para o tubo seguinte.

7- Adicionar 10 µL da diluição do controle positivo abaixo do título (CP), 10 µL da diluição do controle positivo correspondente ao título (CP* título) e 10 µL da diluição acima do título do controle positivo e 10 µL da diluição 1:40 do controle negativo (CN) nos poços correspondentes.

Neste exemplo, utilizaríamos a diluição 1:320.

ATENÇÃO: Evitar que a ponta da ponteira toque ou raspe a superfície da lâmina, pois este procedimento provocará a retirada dos parasitas. Tomar cuidado para que o conteúdo de diferentes poços não se misture.

Utilizar uma ponteira para cada tubo a ser utilizado ou utilizar uma ponteira para cada soro controle na ordem da maior para menor diluição.

8- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos à 37± 1 °C , em estufa.

9- Lavar as lâminas 3 (três) vezes em PBS, em cubas de lavagem apropriadas, por 5 minutos cada lavagem.

10- Lavar rapidamente as lâminas, uma vez, em água destilada ou de qualidade superior.

11- Secar as lâminas por 10 minutos à 37 °C ± 1 °C, em estufa.

OBS: Observar se as lâminas estão totalmente secas. Caso necessário deixá-las na estufa até que estejam totalmente secas. Tomar o cuidado para não exceder muito o tempo.

12- Preparo da solução de PBS + Azul de Evans (PBS-AE) a 0,004%: Colocar em um tubo 100 µL de Azul de Evans (0,1%) e 2400 µL de PBS.

Diluir o conjugado Anti-Ig Humano / FITC em PBS-AE;conforme descrito a seguir:

13- Diluição do Conjugado

13.1 - Fazer a diluição do conjugado em 1/100 a 1/1200;

13.2 - Fazer uma pré-diluição 1/100 do conjugado em PBS + Azul de Evans colocando 15 µL de conjugado em 1485 µL de PBS + Azul de Evans. Após a pré-diluição, fazer as diluições seriadas, conforme a tabela 1.

Tabela 1: Diluição do conjugado

Título do Conjugado	Pré-diluição	PBS + Azul de Evans
1/ 200	100 µl	100 µL
1/ 300	100 µL	200 µL
1/ 400	100 µL	300 µL
1/ 500	100 µL	400 µL
1/ 600	100 µL	500 µL
1/ 700	100 µL	600 µL
1/ 800	100 µL	700 µL
1/ 900	100 µL	800 µL
1/ 1000	100 µL	900 µL
1/1100	100 µL	1000 µL
1/1200	100 µL	1100 µL

Obs.: Se o título não for encontrado na diluição 1/1000, continuar as diluições.

14- Homogeneizar e adicionar 15 µL das diluições do conjugado em cada poço, conforme esquema a seguir:

Lâmina 1	Lâmina 2

CP* título = diluição referente ao título do soro controle positivo para Doença de Chagas.

15- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos a 37 °C ± 1 °C.

16- Lavar as lâminas 3 (três) vezes em PBS, em cubas de lavagem apropriadas, por 5 minutos cada lavagem.

17- Lavar rapidamente as lâminas, uma vez, em água destilada ou de qualidade superior.

18- Colocar as lâminas por 10 minutos a 37 °C ± 1 °C, em estufa, para secar.

OBS: Observar se as lâminas estão totalmente secas. Caso necessário deixá-las na estufa até que estejam totalmente secas. Tomar o cuidado para não exceder muito o tempo.

19- Adicionar 1 gota de glicerina tamponada sobre cada orifício da lâmina, cobrindo-a com a laminula. Manter as lâminas ao abrigo da luz e umidade, até o momento da leitura.

DEFINIÇÃO DO TÍTULO DO CONJUGADO:

Para a leitura das reações e definição do título do conjugado, utilizar o microscópio de imunofluorescência e objetiva com aumento de 40X. O título do conjugado corresponderá à diluição em que se observar fluorescência até o poço correspondente ao título do soro controle positivo (vide rótulo do frasco), e ausência de fluorescências nas diluições correspondentes ao soro controle negativo. Conforme pode ser observado no exemplo da figura abaixo.

Obs. 1: O limite mínimo aceitável da titulação do conjugado para aprovação do teste de Imunofluorescência indireta deve ser de 1:100.

Obs. 2: Aconselhável que as leituras das lâminas sejam realizadas por duas pessoas qualificadas.