

# IFI - LEISHMANIOSE HUMANA

## Bio-Manguinhos

Imunofluorescência indireta para diagnóstico da  
Leishmaniose humana

**(600 Determinações)**

Uso em diagnóstico *in vitro*



### IFI - LEISHMANIOSE HUMANA – BIO-MANGUINHOS

Imunofluorescência indireta para diagnóstico da Leishmaniose humana

600 DETERMINAÇÕES

Conservar de 2 °C a 8 °C

Uso em diagnóstico *in vitro*

#### INDICAÇÃO DE USO

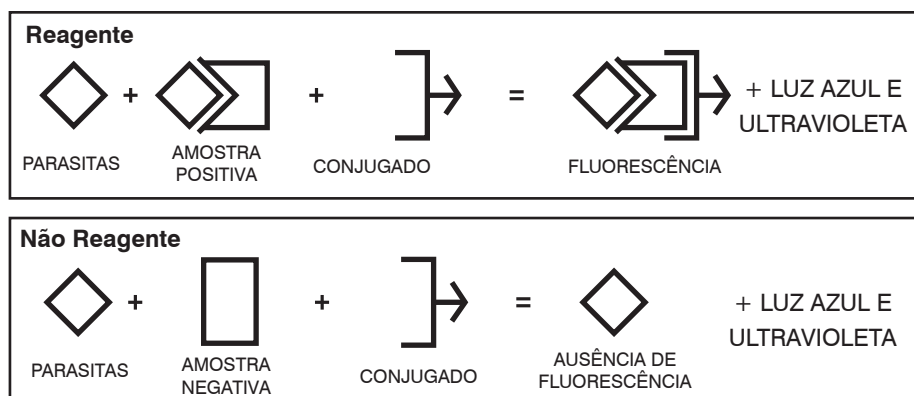
O kit IFI Leishmaniose Humana Bio-Manguinhos é utilizado na detecção de anticorpos contra Leishmania, em soros ou plasma humanos.

#### PRINCÍPIO DO TESTE

O conjunto apresentado é utilizado na detecção de anticorpos contra Leishmania em soros humanos. O teste de imunofluorescência indireta consiste na reação de soros com os parasitas (Leishmania), fixados em lâminas de microscopia. Numa etapa seguinte, utiliza-se um conjugado fluorescente para evidenciar a reação.

A leitura é realizada com auxílio de microscópio que utiliza incidência de luz azul e ultravioleta, sendo considerado reagente 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



## MATERIAL FORNECIDO

Componentes	Apresentação
Antígeno de Leishmania	01 frasco com 6,0 mL
Conjugado Anti-humano / FITC	01 frasco com 0,3 mL
Glicerina Tamponada pH 9,0 ± 0,5	02 frascos com 6,0 mL
Azul de Evans 0,1%	01 frasco com 1,5 mL
Lâminas para IFI	50 unidades

## MATERIAL COMPLEMENTAR NÃO FORNECIDO

- Controle positivo (com título conhecido, preferencialmente, entre 1:160 e 1:640)
- Controle negativo.
- Tampão fosfato/salina (PBS) - pH 7,2.
- Lamínulas.
- Microplacas, micropipetas ou tubos e pipetas para diluições.
- Câmara úmida e cubas de lavagem.
- Microscópio para fluorescência.

## CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL

O conjunto deverá ser conservado entre 2° e 8°C.

Todos os componentes do teste devem ser guardados nas temperaturas indicadas desde o ato do recebimento do conjunto, permanecendo estáveis pela validade definida na caixa principal do kit.

**Obs.:** a temperatura de transporte, com bobinas de gelo reciclável, permite que o conjunto se mantenha em condições adequadas 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 deste conjunto, observe as precauções de biossegurança necessárias. A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende do cumprimento das boas normas de segurança do laboratório, tais como:

- as amostras, assim como os controles, podem conter agentes infecciosos e devem ser manipulados com cuidado;
- homogeneizar as amostras e 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, lâminas usadas, etc., em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária;
- nunca misturar componentes de lotes diferentes;
- utilizar frascos e vidrarias rigorosamente limpos, pois resíduos de detergentes e/ou substâncias oxidantes poderão interferir na reação;
- não usar os reativos após sua data de validade.

## PREPARO DO TAMPÃO FOSFATO PH 7,2 (PBS)

Sais	Quant.
Cloreto de Sódio (NaCl) PA 0,15M	8,77 g
Fosfato de Sódio Dibásico Anidro (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) PA 0,0072M	1,02 g
Fosfato de Sódio Monobásico Anidro (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 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:

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Anidro - Peso Molecular = 142      pesar 1,02 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O - Peso Molecular = 358      pesar X g

$$142 - 1,02 \quad X = \frac{1,02 \times 358}{142} = 2,57 \text{ g}$$

$$358 - X \quad 142$$

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

### TITULAÇÃO DO CONJUGADO

O título do conjugado varia em função das condições de trabalho, do microscópio utilizado e do operador. O laboratório deverá repetir a titulação do conjugado sempre que houver troca de lote do kit, do microscópio ou quando se observar queda da intensidade da fluorescência no controle positivo ao longo do tempo.

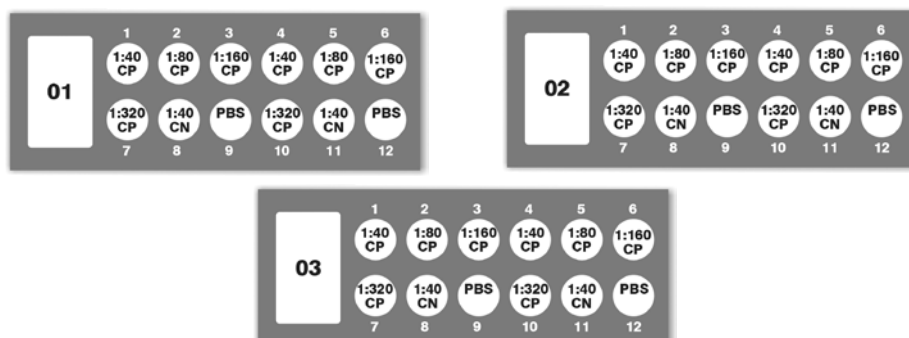
1- Ferver as lamínulas em água destilada por 30 minutos, após a água entrar em ebulição e deixá-las estocadas em álcool comercial até a utilização, quando deverão ser cuidadosamente limpas e secas com o auxílio de gaze ou papel absorvente.

2- Separar 3 lâminas e pingar 10 µL do antígeno em cada orifício, tendo o cuidado de mantê-lo homogeneizado durante o preparo.

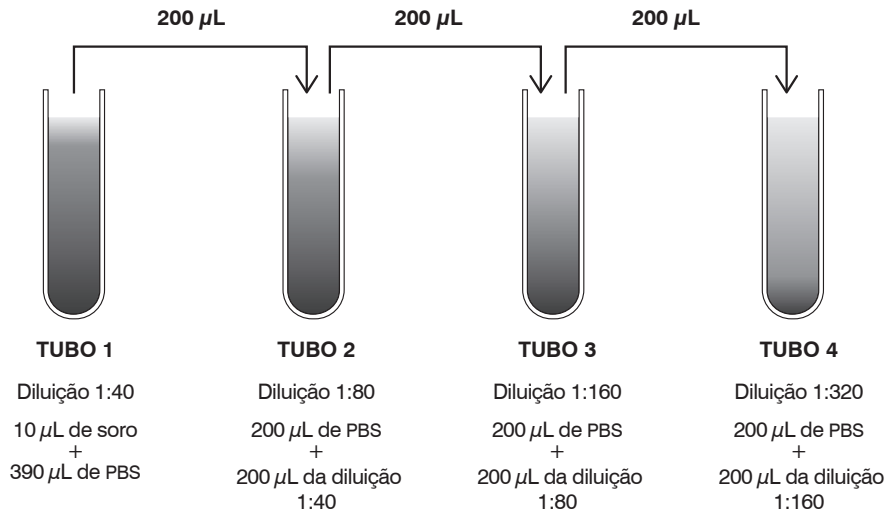
3- Deixar secar de um dia para o outro a temperatura ambiente ou duas horas a 37 °C, para uma boa fixação dos parasitas.

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

4- Fazer um protocolo de trabalho, conforme modelo abaixo, indicando a posição das diluições do Controle Positivo (CP), e do Controle Negativo (CN), além dos controles do conjugado (PBS).



5- Diluir em PBS o controle positivo 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, e diluir o controle negativo 1/40, utilizando o esquema de diluição seriada a seguir:



**ATENÇÃO:** homogeneizar o conteúdo de cada tubo antes de transferir o volume de 200 µL para o tubo seguinte.

6- Adicionar 10 µL das diluições de soro por orifício, conforme o seu protocolo, em cada uma das 3 lâminas anteriormente preparadas.

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

7- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos a 37 °C, em estufa.

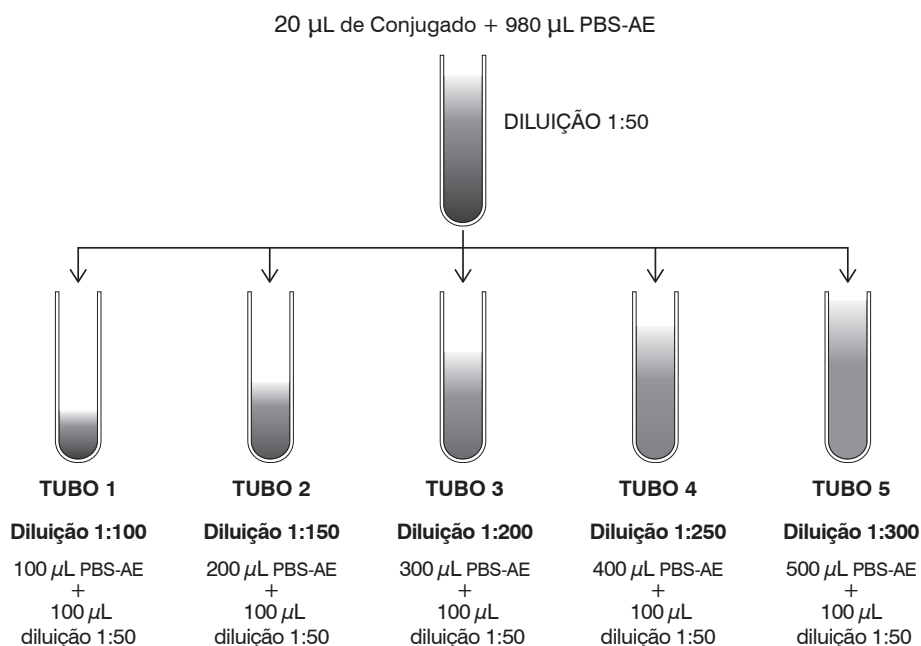
8- Lavar as lâminas 3 (três) vezes em PBS, nas cubas de lavagem, por 5 minutos cada banho.

9- Lavar rapidamente as lâminas, uma vez em água destilada.

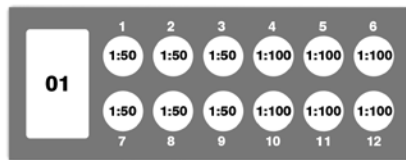
10- Colocar as lâminas por aproximadamente 10 minutos a 37 °C, em estufa, para secar. No entanto não exceder muito nesta etapa.

11- Preparar uma solução de PBS-Azul de Evans (PBS-AE) a 0,004%. Colocar em um tubo 120 µL de Azul de Evans (0,1%) e 2880 µL de PBS.

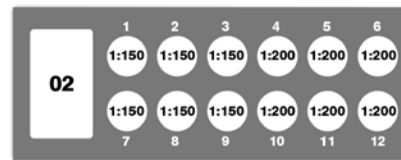
12- Diluir o conjugado anti-Ig humano marcado com fluoresceína, conforme descrito a seguir:



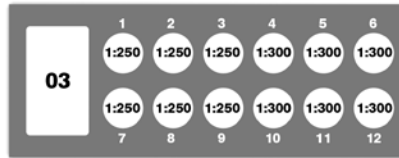
13- Adicionar 15 µL das diluições do conjugado por orifício nas lâminas correspondentes conforme esquema a seguir:



Lâmina 1 - Diluição 1:50  
Lâmina 1 - Diluição 1:100



Lâmina 2 - Diluição 1:150  
Lâmina 2 - Diluição 1:200



Lâmina 3 - Diluição 1:250  
Lâmina 3 - Diluição 1:300

14- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos a 37 °C, em estufa.

15- Lavar as lâminas 3 (três) vezes com PBS em cuba de lavagem apropriada, 5 minutos cada lavagem e, em seguida, lavar rapidamente as lâminas uma vez em água destilada.

16- Colocar as lâminas por aproximadamente 10 minutos em estufa a 37 °C para secagem. No entanto, não exceder muito nesta etapa.

17- Adicionar de 3 a 4 gotas de glicerina tamponada sobre as lâminas, cobrindo-as com lamínula. Mantê-las ao abrigo da luz e umidade, até o momento da leitura.

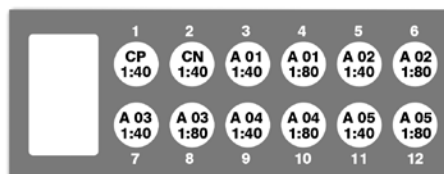
## DEFINIÇÃO DO TÍTULO DO CONJUGADO

Para a leitura, utilizar o microscópio de imunofluorescência e objetiva com aumento de 40X. O título do conjugado será a diluição em que se observar fluorescência até o poço correspondente ao título do controle positivo (vide rótulo do frasco) e ausência de fluorescência nas diluições correspondentes ao controle negativo e ao PBS (controle de conjugado).

## PROCEDIMENTO DO TESTE

1- Ferver as lamínulas em água destilada por 30 minutos, após a água entrar em ebulição e deixá-las estocadas em álcool comercial até a utilização, quando deverão ser cuidadosamente limpas e secas com o auxílio de gaze ou papel absorvente.

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



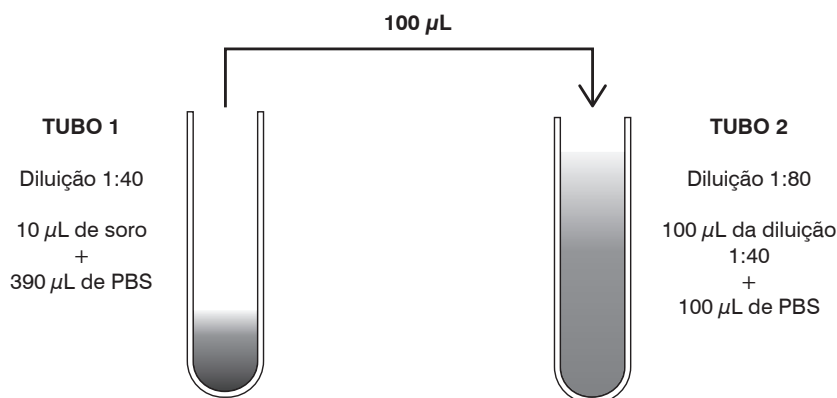
**Obs. 1:** Conforme recomendação de especialistas, as amostras teste devem ser submetidas ao ensaio de imunofluorescência pelo menos nas diluições 1:40 e 1:80.

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

3- Pingar 10 µL do antígeno em cada orifício da lâmina, tendo o cuidado de mantê-lo homogêneo durante o preparo. Deixar secar de um dia para o outro à temperatura ambiente, ou duas horas a 37 °C, para uma boa fixação dos parasitas.

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

4- Diluir as amostras (1:40 e 1:80) e os controles positivo (1:40) e negativo (1:40), em PBS, conforme esquema a seguir:



5- 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.

6- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos a 37 °C.

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

8- Lavar rapidamente as lâminas, uma vez em água destilada.

9- Colocar as lâminas por aproximadamente 10 minutos a 37 °C para secar. No entanto, não exceder muito nesta etapa.

10- Preparar, momentos antes do uso, uma solução PBS-AE, conforme tabela abaixo:

n° lâminas	Vol. PBS	Vol. Azul de Evans (0,1%)
2	480 µL	20 µL
4	960 µL	40 µL
6	1440 µL	60 µL

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

**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.

12- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos a 37 °C, em estufa.

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

14- Lavar rapidamente as lâminas, uma vez em água destilada.

15- Colocar as lâminas por aproximadamente 10 minutos a 37 °C, em estufa, para secar. No entanto, não exceder muito nesta etapa.

16- Adicionar de 3 a 4 gotas de glicerina tamponada sobre as lâminas, cobrindo-as com lamínula. Mantê-las 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. Focalizar a lâmina na posição do controle positivo e observar a fluorescência presente, de acordo com o padrão descrito a seguir.

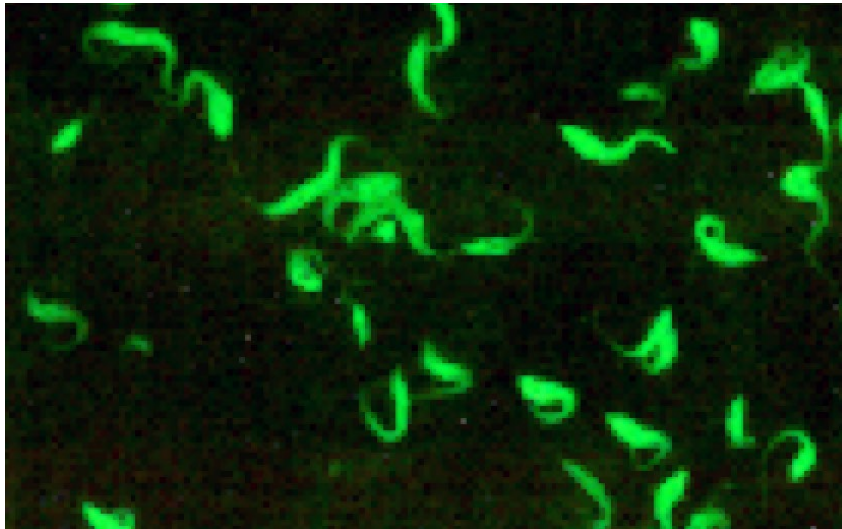
2- Focalizar a lâmina na posição do controle negativo e observar a ausência de fluorescência nos parasitas, bem como a coloração de fundo “background”.

3- Proceder a leitura das amostras, considerando os padrões a seguir:



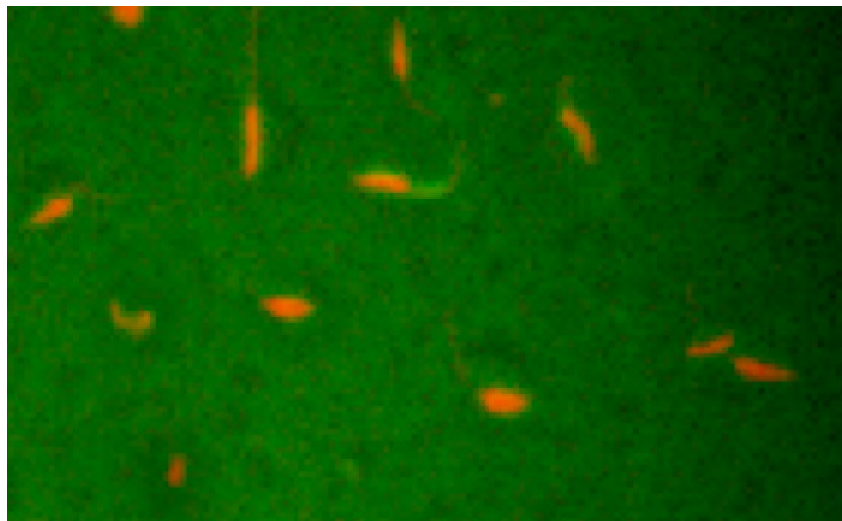
### Amostra reagente

As amostras que, a partir da diluição 1:40, apresentarem fluorescência na membrana do parasito.



### Amostra não reagente

As amostras que não apresentarem fluorescência.



### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Camargo, M.E. & Rebonato, C., 1969. Cross-reactivity in immunofluorescence for Trypanosoma and Leishmania antibodies. *A.J.Trop.Med.Hyg.*, 18: 500-505.

Cuba, C.A.; Marsden, PH. D; Barreto, A.C.; Rocha, R.; Sampaio, R.R. & Patziuff, L., 1980. Diagnóstico parasitológico e imunológico de Leishmaniose tegumentar americana. *Biol. of Sanit. Param.*, 89: 195-208.

Guimarães, M.C.S.; Celeste, B.J.; Corrales, E.M., 1991. Antígenos de Leishmania-major-like e *L. braziliensis* na reação de imunofluorescência (IgG-IF) na Leishmaniose Muco cutânea. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 24 (supl. II): 112.

*Methods in Immunology - A Laboratory Text for Instruction and Research*, Third Edition, Benjamin Cummings Publishing Company, 1981.

*Fluorescent Antibody Techniques*, CDC nº 729, USA, 1961.

*Labelled Antibodies in Biology and Medicine*, Abacus Press and McGraw Hill International Book Company, 1978.

## **ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS**

**Anvisa** 10106330011

Responsável técnico: Edimilson Domingos da Silva, CRBio-02 N° 021433/02.

### **Fabricante:**

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos

Av. Brasil, 4.365 – Manguinhos – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro - RJ

CNPJ: 33.781.055/0015-30 – Indústria Brasileira

### **Regularizado por:**

Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz

Av. Brasil, 4.365 – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro - RJ

CNPJ 33.781.055/0001-35

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

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos

Av. Brasil, 4.365 – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro - RJ

CNPJ 33.781.055/0015-30

SAC: 0800 021 0310 ou [sac.reativos@bio.fiocruz.br](mailto:sac.reativos@bio.fiocruz.br)

Para versão impressa deste manual, entre em contato com o SAC.

## **PROIBIDA VENDA AO COMÉRCIO**