

## Apêndice 7

### Teste de aglutinação direta (TAD)

**Organismo:** Cultura *in vitro* de promastigotas de (uma cepa local de) *L. donovani* / *L. infantum* / *L. chagasi*.

### Reagentes:

Solução de Locke:	Glicose	0,25 % (p/v)
	Cloreto de sódio	0,9 % (p/v)
	Cloreto de potássio	0,04 % (p/v)
	Cloreto de cálcio	0,02 (p/v)
	Bicarbonato de sódio	0,02 (p/v)

Solução salina em citrato	Cloreto de sódio	8.77 gr
	Água destilada (completar ate)	1000 ml
	Ajustar o pH para 7.4 adicionando 0,056 M de citrato tri-sódico (16,46 gr/1000 ml).	

**Diluyente:** Usar solução salina em citrato pH 7.4, contendo 1 % (v/v) de soro fetal bovino inativado pelo calor\* e 0,1 M de 2-mercapto-etanol (0,2 M para os cães).

### Preparação do antígeno:

1. Coletar as promastigotas por centrifugação a 4000 g durante 10 minutos, a 4 ° C.
2. Lavar (5x) a resuspensão em solução fria de Locke e centrifugar a 3.200g durante 10 minutos, a 4 ° C.
3. Preparar a solução de tripsina (0,4 % (p/v) tripsina 1:250 - Difco) em solução de Locke, ajustar o pH para 7.7.
4. Adicionar a solução de tripsina as promastigotas sedimentadas, na proporção de um volume de promastigotas para 20 volumes de solução de tripsina.

---

\* O soro de feto bovino pode ser substituído, no diluyente, por gelatina a 0,2 %. Adicionar a gelatina à solução salina em citrato para alcançar uma concentração final de 0,2 % (p/v); aquecer a 56 ° C, durante 10 minutos, para dissolver a gelatina; deixar esfriar a temperatura ambiente e, a seguir, adicionar 2-mercapto-etanol.

5. Misturar completamente os promastigotas e, a seguir, incubar a 37 ° C, durante 45 minutos.
6. Centrifugar a suspensão (3.200g – 10 minutos) e, a seguir, lavar (5x), conforme o parágrafo 2, anterior.
7. Resuspender o sedimento em solução fria de Locke, até uma concentração de aproximadamente  $2 \times 10^8$  células/ml.
8. Adicionar o mesmo volume de formaldeído a 2 %, em solução fria de Locke. Deixar descansar a 4 ° C, durante a noite.
9. Centrifugar a 3.200g – 10 minutos, a 4 ° C. Lavar o sedimento em solução salina em citrato fria. Re-suspender até a mesma concentração, conforme o parágrafo 8, anterior.
10. Adicionar corante azul de Coomassie até uma concentração final de 0,1 % (p/v). Misturar em agitador magnético, a velocidade moderada, durante 90 minutos.
11. Centrifugar (3.200 g – 10 minutos) e lavar o depósito (2x) em solução salina em citrato.
12. Resuspender em solução salina em citrato, contendo formaldeído a 0,4 %, até formar o mesmo volume do parágrafo 10, anterior.
13. Armazenar a 4 ° C, protegido da luz. **NÃO CONGELAR.**

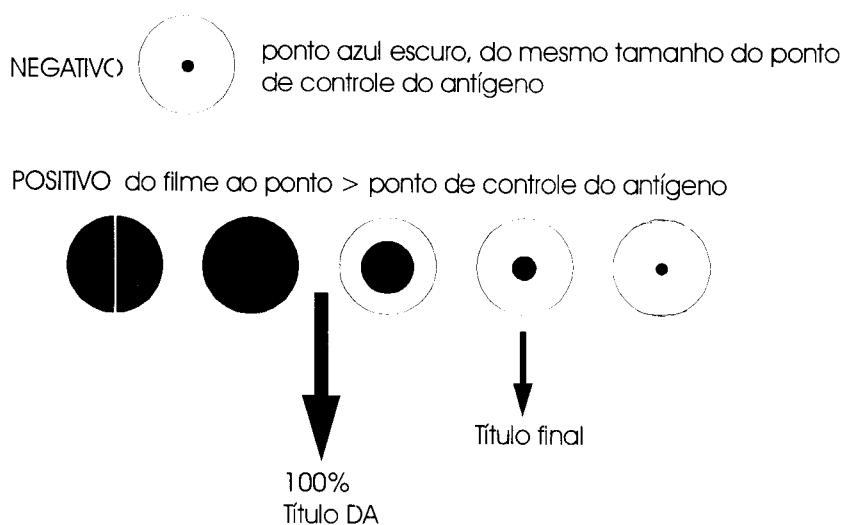
#### **Procedimento para realizar o teste TAD**

1. **Usar placas de microtitulação** com poços em forma de “V” e **não** de “U”. Preparar as placas de microtitulação, preencher o formulário correspondente: número da placa, data e código da amostra.
2. Diluir o soro a ser testado 1/100 com solução salina em citrato/FCS/2-mercaptoetanol como diluente. Incubar a 37 ° C, durante 30 minutos.
3. No caso de placa de microtitulação com 12 fileiras, pipetar 50µl de diluente em cada poço, com exceção do poço n° 2.
4. No poço n° 2, pipetar 100 µl da diluição 1:100 do soro sendo testado (ver parágrafo 1, anterior).
5. Transferir 50 µl do poço n° 2 ao poço n° 3, misturar e, a seguir, transferir 50 µl do poço n° 3 ao poço n° 4. Continuar essa operação em série, em toda a placa, descartando os 50 µl retirados do poço n° 12, no fim da placa.
6. Os soros de controle positivo e negativo devem ser sistematicamente incorporados a poços separados.

7. Sacudir suavemente o antígeno TAD para re-suspender os organismos e, a seguir, pipetar 50µl de antígeno no poço n° 12, 50µl de antígeno no poço n° 11 e assim por diante, até colocar antígeno em todos os poços.
8. Cobrir a placa com tampa ou filme plástico, incliná-la suavemente no sentido horário e anti-horário, durante 60 segundos e incubá-la durante a noite, a temperatura ambiente, na posição horizontal, onde não haja perigo de sacudidas. Evitar, cuidadosamente, derramar líquido de um poço para outro.

**Leitura do teste:** Colocar a placa de microtitulação sobre uma folha simples de papel branco ou uma caixa de luz, e observar a placa de cima para baixo. O teste deve ser lido, separadamente, por duas pessoas.

**Figura:**



**Ponto final:** Esse é o último poço onde é possível ver aglutinação, ou seja, o poço anterior a um “botão” azul, de bordas bem delineadas, transparente, no fundo do poço, como aquele visto no poço de controle sem-soro (poço n° 1).

Em geral, os títulos  $\geq 1/3200$  são considerados positivos para a LV humana (títulos menores são usados, algumas vezes, para a LV canina).

As placas de microtitulação podem ser utilizadas novamente após a leitura do teste, contanto que sejam lavadas, cuidadosamente, com sulfato dodecílico de sódio a 0,25 %, enxaguadas com água destilada e secadas ao ar. Se possível, recomenda-se usar placas novas.