

Apêndice 8

Teste de imunofluorescência indireta de anticorpos (IFI)

Reagentes:

Solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7.2

NaCl	8 gr
KH ₂ PO ₄	0,2 gr
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,88 gr
KCl	0,2 gr
Água destilada	1000 ml

(Pode ser preparada numa concentração 10X superior à da receita anterior, para melhor armazenamento de longo prazo.)

PBS/Tween a 0,05 % (PBS/T)

Solução de PBS	99,95 ml
Tween 20	0,05 ml

PBS/T/leite em pó a 2 % (PBS/T/M)

Solução de PBS/T	100 ml
Leite desnatado em pó (baixo teor de gordura)	2,00 gr

OBS/glicerol a 10 % (v/v)

Solução de PBS	90,00 ml
Glicerol	10,00 ml

A) Princípio:

O “antígeno de Manguinhos” é utilizado para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* (visceral) e *Leishmania braziliensis* (cutânea). Tem apresentado resultados bastante satisfatórios no diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina

Consiste na reação inicial de soros com parasitas (*Leishmania*), fixados em lâmina de microscópica para fluorescência. Numa etapa seguinte, utiliza-se um conjugado fluorescentes (isotianato de fluoresceína).

B) Material necessário:

- * Soros controle: positivo e negativo;
- * PBS;
- * Conjugado anti-globulina marcada com isotianato de fluoresceína;
- * solução de azul de Evans 0.1 % em PBS;
- * Glicerina tamponada pH 0.6;
- * Água destilada;
- * Lâminas para IF;
- * Lamínulas;
- * Microplacas e micropipetas;
- * Cubas de lavagem;
- * Câmara úmida;
- * Microscópio de fluorescência.

C) Metodologia

- I. Ferver as lâminas e lamínulas em água destilada por 30 min., após a água entrar em ebulição;
- II. Deixá-las estocadas em álcool comercial até o momento de uso, quando deverão ser cuidadosamente secas com o auxílio de gaze ou papel absorvente;
- III. Pingar 10 ml antígeno em cada orifício da lâmina, tendo o cuidado de mantê-lo homogêneo durante o preparo das lâminas;
- IV. Deixar secar durante 30 min. em temperatura ambiente (evitar atritos com a parte superior da lâmina onde se encontram os parasitos fixados);
- V. Diluir os soros teste (1:40 e 1:80) e os controles positivo e negativo (1:40), em PBS;
- VI. Adicionar 10 ml das diluições de soro por orifício, conforme o protocolo:
 - A. Os soros controle devem estar presentes em todas as lâminas para comparações no momento da leitura;
 - B. Deve-se tomar cuidado com as diluições de soro para que não se misturem durante a incubação;
- VII. Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 min./37° C;

- VIII. Lavar as lâminas 3 vezes em PBS em cubas de lavagem (3), 5 minutos em cada banho;
- IX. Lavar rapidamente as lâmina (uma vez) em água destilada;
- X. Colocar as laminas por aproximadamente 10 min/37° C para secar (não exceda muito nesta etapa);
- XI. Diluir o conjugado fluorescente, previamente titulado (vide bula do conjugado), em PBS contendo 0.004% de azul de Evans;
- XII. Adicionar 15 ml da diluição do conjugado em cada orifício da lâmina;
- XIII. Incubar as lâminas 3 vezes com PBS em cubas de lavagem (5 min. para cada banho);
- XIV. Lavar rapidamente as lâminas 1 vez em água destilada;
- XV. Colocar as lâmina por aproximadamente 10 min/ 37° C para secar (não exceda muro nesta etapa);
- XVI. Montar as laminas com glicerina tamponada e lamínulas;
- XVII. Levar as laminas ao microscópio de fluorescência e:
 - A. Focalizar o orifício do soro controle negativo e observar a fluorescência;
 - B. Focalizar o orifício do soro controle negativo e observar o "background" (coloração de fundo) do teste;
 - C. Focalizar os orifícios dos soros teste e considerar reativo aqueles que apresentarem fluorescência mais intensa que o "background", observando no orifício do soro controle negativo (considerar não reativo os soros que apresentarem fluorescência semelhante ao do controle negativo);
 - D. Serão considerados reativos todos os soros que apresentarem positividade a partir da diluição 1/40, inclusive.