

INDICAÇÃO:

O produto IMUNOTESTE[®] – TOXOPLASMA (RIFI) – CAPRINO é um kit diagnóstico para a detecção de anticorpos específicos contra o protozoário *Toxoplasma gondii*, presentes em amostras de soro de caprinos, utilizando a técnica de reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

As amostras de soros-teste diluídas são depositadas nas cavidades da lâmina que está recoberta com antígeno íntegro formalizado, portanto não infeccioso, de *Toxoplasma gondii*. Os anticorpos contra o protozoário *Toxoplasma gondii*, caso presentes nas amostras de soro, ligam-se aos antígenos fixados nas cavidades da lâmina, formando uma ligação antígeno-anticorpo. Para essa reação ser visualizada ao microscópio, é necessário antes acrescentar um anti-anticorpo espécie-específico acoplado a um fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína – FITC), no caso, o conjugado anti-IgG de caprino acoplado ao fluorocromo FITC. O conjugado, por sua vez, irá se ligar aos anticorpos, caso estejam presentes na lâmina. O fluorocromo tem a capacidade de absorver determinado comprimento de onda, próximo à luz ultravioleta (UV) e, ao se excitar, consegue emitir fluorescência esverdeada captada por microscópio específico. Portanto, no resultado positivo, ou seja, em que o animal apresente anticorpos contra o protozoário *Toxoplasma gondii*, é possível visualizar os parasitas com toda a sua superfície bem delimitada com fluorescência esverdeada. Enquanto, no resultado negativo, ou seja, em que o animal não apresenta anticorpos contra o protozoário, não há emissão de fluorescência esverdeada e o que se observa é apenas o parasita levemente avermelhado.

COMPOSIÇÃO:

- Lâmina com antígeno fixado (formol 2 %) para o diagnóstico *in vitro* de *Toxoplasma gondii*;
- Soro controle positivo;

- Soro controle negativo;
- Conjugado (anti-Imunoglobulina G caprina/ovina) marcado com isotiocianato de fluoresceína;
- Solução salina tamponada com fosfato (PBS) 10X concentrada, 0,1 M, pH 7,2;
- Solução de glicerina tamponada com carbonato-bicarbonato;
- Solução corante azul de Evans.

APRESENTAÇÃO:

- a)** 10 lâminas de vidro 25,4 X 76,2 mm, 1 mm de espessura, com 12 cavidades (delimitações circulares) de 5 mm Ø, contendo substrato antigênico de *Toxoplasma gondii*, em envelope aluminizado;
- b)** 1 frasco de vidro com 0,25 mL de soro controle positivo - PRONTO PARA USO;
- c)** 1 frasco de vidro com 0,25 mL de soro controle negativo - PRONTO PARA USO;
- d)** 1 frasco de vidro com 1,5 mL de conjugado;
- e)** 1 frasco plástico com 100 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) 10X concentrada;
- f)** 1 frasco de vidro com 3 mL de glicerina tamponada - PRONTO PARA USO;
- g)** 1 frasco de vidro com 3 mL de azul de Evans - PRONTO PARA USO.

PREPARO DOS REAGENTES:

- Conjugado

Pipetar 140 µL do conjugado em microtubos tipo eppendorf e acrescentar 14 µL de solução de azul de Evans. Envolver o frasco em papel alumínio para proteger da luz. A solução está pronta para uso e é suficiente para as 12 cavidades de uma lâmina.

- Solução salina tamponada (PBS) 1X concentrada

Diluir o PBS 10X concentrado (ex. 10 mL de PBS 10X concentrado + 90 mL de água destilada ou purificada).

- Soros teste

Centrifugar os soros teste a 2744 x g durante 15 minutos, em temperatura ambiente. Diluir o soro centrifugado, partindo-se da diluição inicial de 1:64 (ex. 1 µL de soro + 63 µL do PBS 1X concentrado).

PROCEDIMENTO:

1. Retire as lâminas do refrigerador e deixe-as secar em temperatura ambiente por 10 a 15 minutos;
2. Adicione 10 µL do soro controle negativo na cavidade de número 6 da lâmina e 10 µL do soro controle positivo na cavidade número 7;
3. Adicione 10 µL dos soros teste diluídos nas cavidades restantes, registrando-se a posição de cada um conforme a marcação na lâmina;
4. Incube as lâminas por 30 minutos em estufa a 37 °C, em câmara úmida;
5. Utilizando cuba de vidro, lave as lâminas três vezes em PBS 1X concentrado, 5 minutos em cada lavada;
6. Com a lâmina seca, adicione 10 µL do conjugado diluído em azul de Evans em cada cavidade;
7. Incube as lâminas por 30 minutos em estufa a 37 °C, em câmara úmida;
8. Utilizando cuba de vidro, lave as lâminas três vezes em PBS 1X concentrado, 5 minutos em cada lavada;
9. Com a lâmina seca, monte-as com glicerina tamponada e lamínula e faça a leitura em microscópio equipado para leitura de imunofluorescência, usando objetiva de 40X.

Observação: Após a montagem, proteja as lâminas da exposição à luz e faça a leitura em seguida.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS:

1. **Reação positiva:** os parasitas apresentarão fluorescência esverdeada distribuída por toda a sua superfície.
2. **Reação negativa:** não haverá fluorescência e o campo aparecerá escuro.

ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO KIT:

O teste para detecção de anticorpos anti *Toxoplasma gondii* fornece resultados de especificidade >97 % e sensibilidade >92 %. Em filhotes, recomenda-se o uso do kit apenas após 3 meses de idade, a fim de evitar anticorpos maternos.

MODO DE CONSERVAÇÃO:

Conservar em temperatura entre 2 e 8 °C.

MATERIAIS NECESSÁRIOS PARA A REALIZAÇÃO DO TESTE E NÃO FORNECIDOS NO KIT:

1. Microscópio de Imunofluorescência para FITC (Isotiocianato de Fluoresceína);
2. Estufa de incubação para temperatura de 37 °C;
3. Micropipetas para os seguintes volumes: 1 µL; 10 µL; 14 µL; 39 µL e 140 µL;
4. Cronômetro ou relógio;
5. Lamínulas 24 x 60 mm;
6. Frasco para estocar a solução de PBS diluída;
7. Água destilada ou purificada;
8. Ponteiras descartáveis de 10 µL e 200 µL;
9. Proveta para volumes de 100 mL e 1000 mL;
10. Microtubos (tipo eppendorf) de 0,2 ou 0,6 mL para diluição do conjugado;
11. Microtubos (tipo eppendorf) para diluição dos soros ou similares (placa de 96 poços reutilizável);
12. Centrífuga.

USO DE PARAMENTAÇÃO:

Durante a realização dos testes recomenda-se que o colaborador esteja paramentado com avental de manga longa e luva descartável.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS:

- Em caso de presença de cristais no PBS 10X, recomenda-se aquecê-lo até a completa dissolução dos cristais para posterior diluição do tampão.
- Seguir as recomendações de conservação.
- Manter ao abrigo da luz direta e à umidade excessiva.
- Seguir as instruções de uso para que os resultados sejam válidos.
- Não usar reagentes após a data de validade.
- Realizar manutenção periódica do microscópio, pois a extrapolação da vida útil da lâmina prejudica a análise dos resultados.

DESCARTE:

1. Todo material utilizado durante os testes e os resíduos gerados devem ser descartados em lixeira apropriada para material infectante (lixo biológico).
2. As lâminas devem ser descartadas em embalagem apropriada para material perfurocortantes.
3. A caixa, suporte interno da caixa e os frascos do produto, podem ser descartados como material reciclável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

GONDIM, L. F. P.; BARBOSA, H. V.; FILHO, C. H. A. R.; SAEKI, H. Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 82, p. 273-276, 1999.

DE LIMA, J. T. R.; AHID, S. M. M.; BARRÊTO JUNIOR, R. A.; PENA, H. F. J.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em rebanhos caprinos do município de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 45, n. 2, p. 81-86, 2008.

MORAES, L. M. B.; RAIMUNDO, J. M.; GUIMARÃES, A.; SANTOS, H. A.; JUNIOR, G. L. M.; MASSARD, C. L.; MACHADO, R. Z.; BALDANI, C. D. Occurrence of anti-*Neospora caninum* and anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies in goats and sheep in western Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 312-317, 2011.

GARCIA, G.; SOTOMAIOR, C.; NASCIMENTO, A. J.; NAVARRO, I. T.; SOCCOL, V. T. *Toxoplasma gondii* in goats from Curitiba, Paraná, Brazil: risks factors and epidemiology. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 42-47, 2012.

OSSANI, R. A.; BORGES, H. A. T.; SOUZA, A. P.; SARTOR, A. A.; MILETTI, L. C.; FEDERLE, M.; MOURA, A. B. *Toxoplasma gondii* in milk of naturally infected dairy ewes on West mesoregion of Santa Catarina State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 5, p. 1294-1300, 2017.

Licenciado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob nº 10.536/2022 em 03/09/2022

PROPRIETÁRIO E FABRICANTE:

Imunodot Diagnósticos Ltda
Rua Dr. Mário de Campos, 1150 • Jardim São Marcos I
CEP: 14887-200 • Jaboticabal/SP
Contato: (16) 3203 8847
E.mail: contato@imunodot.com.br
www.imunodot.com.br
CNPJ/MF nº 05.870.841/0001-73
RESPONSÁVEL TÉCNICO:
Celio Raimundo Machado – CRMV/SP nº 2812

