



Medizinische Labordiagnostika Soukou

# AntiCruZ

(Indirect immunofluorescence assay for the detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies)

(Indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von *Trypanosoma cruzi*-Antikörpern)

(Essai pour la détection d'anticorps de la trypanosomiase américaine)

MANUAL

PAGE 2-3

GEBRAUCHSANWEISUNG

SEITE 4-5

NOTICE D'UTILISATION

PAGE 6-7



## Manual

PLEASE READ CAREFULLY

# AntiCruZ

(Indirect immunofluorescence assay for the detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies)

Only for professional use

### Application

In this indirect immunofluorescence assay slides with coated *Trypanosoma cruzi* infected rat heart are used to detect antibodies from human sera of patients with potential of Chagas' disease.

### Principle

In a first step the diluted serum will be incubated on a slide with coated heart muscle cells. If antibodies against *T. cruzi* antigen in the patient sample are present, they will bind to Pseudocytan of the heart muscle. In a washing step unbound serum components will be removed. By incubation with fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated antibodies which are directed against immunoglobulin of class G, A, and M, the bound antibodies of the serum sample can be specifically labeled. After a further washing step and embedding the tissue section it can be examined under a fluorescence microscope.

### Storage and stability

 light protected 2-8°C (fridge)

 10 months from date of manufacture

### Content

- Slides with coated antigen fields
- Serum positive control, ready to use
- Serum negativ control, ready to use
- FITCIg(G, A, M)-conjugate with Evans-Blue, ready to use
- Mounting medium, ready to use
- Blotting paper
- Dilution and washing buffer

### Required utensils and materials

- Distilled water
- Gloves
- Staining cuvettes and slide holder
- Pencil
- Fluorescence microscope
- Test tubes for serum dilution
- Humidity chamber
- Coverslips 24 x 60

### Preparation

Heat the required number of slides, the reagents and the sera to room temperature. Prepare the buffer solution by completely dissolving the entire contents of the bag with the PBS buffer salts in 1000 ml deionized water. Remove slides from the packaging. According to the protocol label them on the mat part of the slices with a pencil and put them in the humid chamber. Prepare the sera in a ration 1:10 with Diluent (for example, 5 µl serum in 45 µl dilution buffer).

### Procedure (see also scheme next page)

**Throughout the implementation the tissue slices must not dry out!**

**Preincubation:** Apply 10 µl of sample buffer to each to be examined fields on the slide, incubate 10 min. and remove the buffer with absorbent paper.

1. Apply a drop of the positive and negative control sera, 15 µl of diluted patient samples to each antigen field on the slide(s). Pay attention to the complete coverage of the tissue section.
2. Incubate the slide(s) 60 min. at 37°C in a humid chamber. Then aspirate with blotting paper the sera without touching the tissue sections.
3. Place the slide(s) into the slide holder and immerse briefly once in the staining buffer filled cuvette. Change the buffer, and then wash the slide(s) twice for 5 min. Wash and take the slide(s) out of the holder.
4. Dry the slide(s) between the antigen fields and apply 25-50 µl of FITC solution (ready to use) to each antigen fields (ensure complete coverage).
5. Incubate the slide(s) 30 min. at 37°C in a humid chamber. Then wash the slide(s) as stated in step 3.
6. Remove the slide(s) from the slide holder and remove excess buffer solution. Add 2 drops of mounting medium to each slide and place the cover glass without damaging the tissue section and without any air bubbles.
7. The evaluation is performed at 400x magnification under a fluorescence microscope.

## Goals of evaluation

1. The result is negative if no or a weak fluorescent background staining is visible. Because of counterstaining the tissue is stained weakly reddish.
2. Investigate the slides within an hour. If the slides are kept refrigerated in a moist chamber, they can be investigated within 24 hours. Let refrigerated slides reach room temperature before you perform the investigation.
3. Examine the slides at 400x total magnification.
4. Drying of slides can disturb the most peripherally situated organisms in the well, which is why you should disregard the reaction of these organisms.
5. The reaction should only be regarded as positive if the majority of the parasites (>80%) have a significant homogeneous surface fluorescence.
6. The intensity of the color reaction of individual pseudocysts may vary. Nevertheless, the degree of coloration is based on the general appearance of the antigen.

If a quantitative statement for a positive result is required, the serum should be titrated.

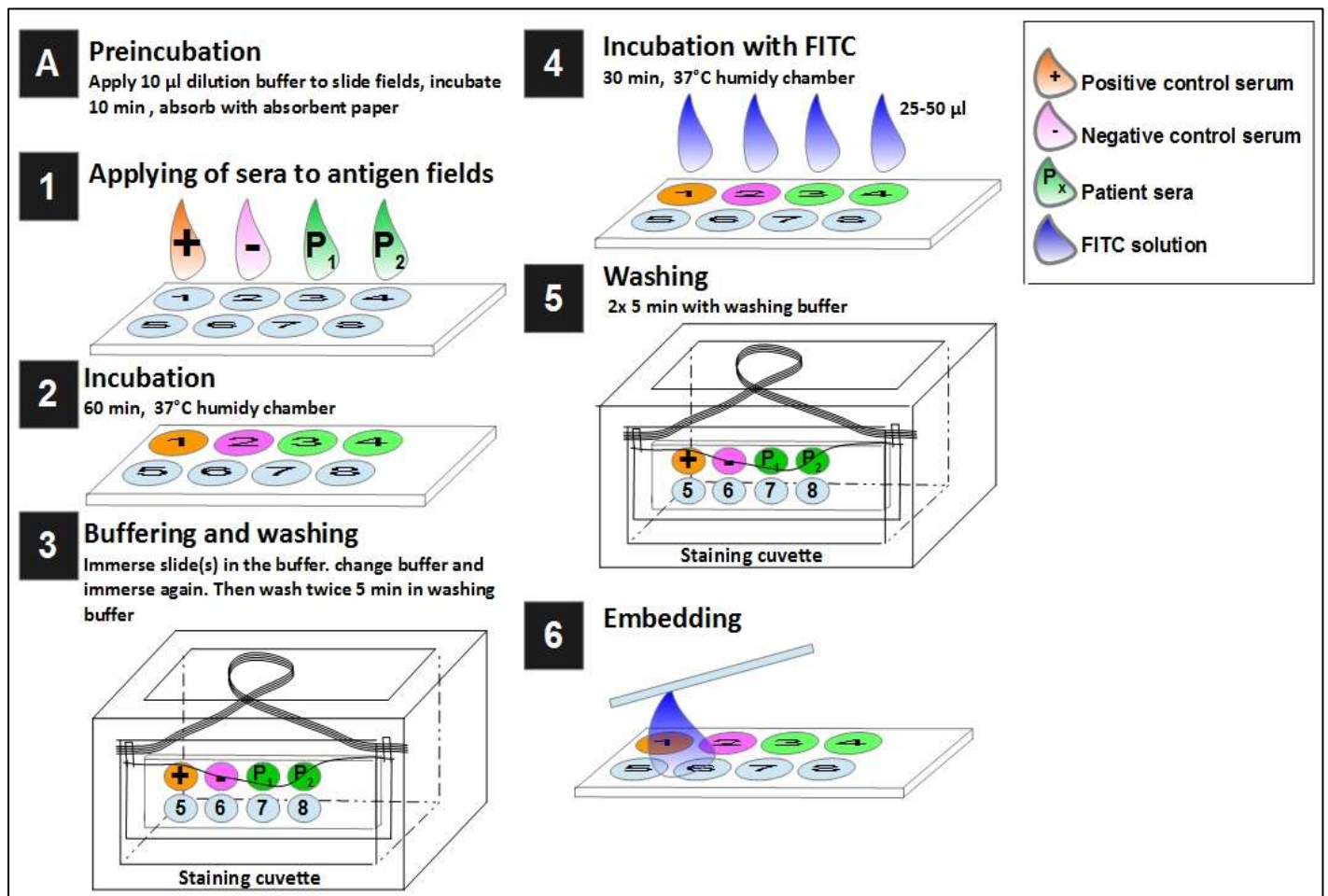
## Safety information

Due to the reagents contain sodium azide as a preservative, skin contact should be avoided. The sera included in the kit were tested as HBsAg and HIV antibody negative. Nevertheless, they should be handled as potentially infectious and the usual laboratory safety measures should be carried out.

## References

1. Gross, R., Schölmerich P. Lehrbuch der Inneren Medizin, 8. Auflage, Schattauer Verlag Stuttgart – New York 1994
2. Wick G., Baudner S., Herzog F. Immunofluoreszenz Die Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg/Lahn 1976
3. Friemel H. Immunologische Arbeitsmethoden Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1984
4. Bittencourt, AL. Congenital Chagas disease. Am J Dis Child 1976 130:97-103.
5. Koberle F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: The pathology of American trypanosomiasis In: Dawes B. (Ed) Advances in Parasitology 6:63-116 Academic Press, New York
6. Hoff R. et al. *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid during the acute stage of Chagas' disease. N Eng J Med 1978 298:604.
7. Cossio PM et al. Chagasic cardiomyopathy. Am J Pathol 1977 86:533
8. Martini-Campos JV, Tafuri WL. Chagas' enteropathy. Gut 1973 14:910. Northeast Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1978 27:1123-1127.
9. Wkly Epidem Rec WHO 1985 60:37-44.
10. Cerisola JA. Immunodiagnosis of Chagas' disease: hemagglutination and immunofluorescence tests. J Parasitol. 1970 56:409-10

## Scheme (read also chapter „procedure“)





## Gebrauchsanweisung

BITTE SORGFÄLTIG LESEN



### AntiCruz

(Indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von *Trypanosoma cruzi*-Antikörpern)

Nur für den professionellen Gebrauch

#### Anwendung

Bei diesem indirekten Immunfluoreszenz-Test, werden mit *Trypanosoma cruzi* infiziertem Rattenherz beschichtete Objektträger verwendet, um Antikörper aus humanen Seren aus potentiellen Patienten mit der Chagas-Krankheit zu detektieren.

#### Prinzip der Methode

Das zu untersuchende, verdünnte Serum wird auf einem mit Herzmuskel beschichteten Objektträger inkubiert. Sind Antikörper gegen das *T. cruzi*-Antigen in der Patientenprobe vorhanden, binden sie sich an Pseudocyten der Herzmuskulatur. In einem Waschschritt werden nicht gebundene Serumbestandteile entfernt. Durch Inkubation mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) konjugierten Antikörpern, die gegen Immunglobulin der Klasse G, A, und M gerichtet sind, werden die gebundenen Antikörper der Serumprobe spezifisch markiert. Nach einem weiteren Waschschritt wird der Gewebeschnitt eingedeckt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

#### Lagerung und Haltbarkeit

 2-8°C (Kühlschrank)

 10 Monate ab Herstellungsdatum

#### Inhalt

- Objektträger mit beschichteten Antigenfeldern
- Positives Kontrollserum, gebrauchsfertig
- Negatives Kontrollserum, gebrauchsfertig
- FITCIg(G, A, M)-Konjugat mit Evans-Blue, gebrauchsfertig
- Eindeckmittel, gebrauchsfertig
- Papierblotter
- Verdünnungs- und Waschpuffer

#### Benötigten Utensilien

- *Aqua dest.*
- Handschuhe
- Färbeküvetten mit Objektträgerhalter
- Bleistift
- Fluoreszenzmikroskop
- Reagenzröhrchen zur Serumverdünnung

- Feuchte Kammer
- Deckgläser 24 x 60

#### Vorbereitung

Die benötigte Anzahl von Objektträgern, die Reagenzien und die Seren auf Raumtemperatur bringen. Die Pufferlösung wird durch vollständiges Auflösen des gesamten Inhalts des Beutels mit den PBS-Puffersalzen in 1000 ml deionisiertem Wasser hergestellt und durchmischt. Die Objektträger aus der Verpackung nehmen und auf dem Mattfeld mit einem Bleistift dem Protokoll entsprechend beschriften und in die Feuchtkammer legen. Die Seren werden im Verhältnis 1:10 mit Verdünnungspuffer bereitet (z.B. 5 µl Serum in 45 µl Verdünnungspuffer).

#### Durchführung (siehe auch Schema)

**Während der gesamten Durchführung darf der Gewebeschnitt nicht austrocknen!**

Vorinkubation: 10 µl des Verdünnungspuffers auf jedem zu untersuchenden Objektträgerfelder auftragen, 10 Min. inkubieren und anschließend mit Saugpapier abnehmen.

1. Ein Tropfen der positiven und negativen Kontrollseren und 15 µl der verdünnten Patientenseren auf jeweils ein Antigenfeld auftragen. Dabei auf vollständige Bedeckung des Gewebeschnittes achten.
2. Objektträger 60 Min. bei 37°C in der feuchten Kammer inkubieren. Anschließend die Seren ohne Berührung der Gewebeschnitte mit Fließpapier absaugen.
3. Die Objektträger in die Halter setzen und in den mit Puffer gefüllten Färbeküvetten einmal kurz eintauchen. Puffer wechseln, anschließend zweimal je 5 Min. waschen und aus dem Halter nehmen.
4. Die Objektträger zwischen den Antigenfelder trocknen und je Antigenfeld 25-50 µl der gebrauchsfertigen FITC-Lösung auftragen (auf vollständige Bedeckung achten).
5. Die Objektträger 30 Min. bei 37°C in der Feuchtkammer inkubieren. Anschließend wie unter Punkt 3 beschrieben waschen.

- Die Objektträger aus dem Halter nehmen, überschüssige Pufferlösung entfernen, 2 Tropfen Eindeckmedium auf jeden Objektträger geben und das Deckglas ohne Schädigung des Gewebeschnittes luftblasenfrei auflegen.
- Die Auswertung erfolgt bei 400x Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop.

### Auswertungsziele

- Das Ergebnis ist negativ, wenn keine oder eine schwachfluoreszierende Hintergrundfärbung erkennbar ist. Aufgrund der Gegenfärbung ist das Gewebe schwach rötlich gefärbt.
- Lesen Sie die Objektträger innerhalb einer Stunde ab. Wenn die Objektträger gekühlt in einer Feuchtkammer aufbewahrt werden, können sie innerhalb von 24 Stunden abgelesen werden. Lassen Sie gekühlte Objektträger Raumtemperatur annehmen, bevor Sie die Ablesung durchführen.
- Die Objektträger sollten bei 400x Gesamtvergrößerung untersucht werden.
- Ein Austrocknen kann die meist peripher in der Vertiefung gelegenen Organismen stören, deshalb sollten Sie die Reaktionen dieser Organismen nicht beachten.
- Die Reaktion sollte nur dann als positiv bewertet werden, wenn die Mehrheit (>80%) der Parasiten in der Vertiefung eine deutliche homogene Oberflächen-fluoreszenz aufweisen.
- Die Intensität der Farbreaktion einzelner Pseudocyten kann variieren, trotzdem basiert der Grad der Färbung auf dem allgemeinen Erscheinungsbild des Antigens.

Wird eine quantitative Aussage bei einem positiven Ergebnis gewünscht, sollte das Serum titriert werden.

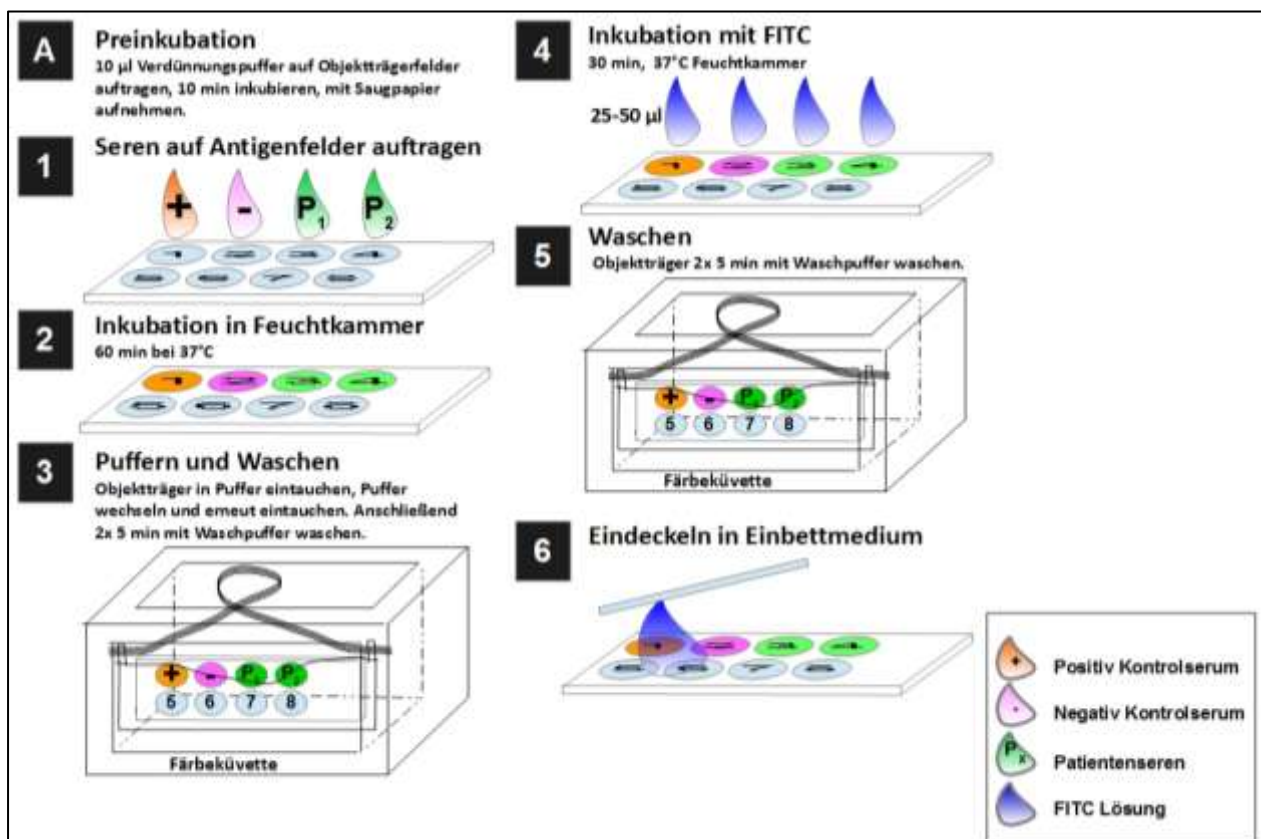
### Sicherheitshinweise/ Vorsichtsmaßnahmen

Da die Reagenzien als Konservierungsmittel Natriumazid enthalten, ist Hautkontakt zu vermeiden. Die im Kit enthaltenen Seren wurden als HbsAg und HIV Antikörper negativ getestet. Trotzdem sollten sie als potentiell infektiös behandelt werden und die Laborsicherheitsmaßnahmen beachtet werden.

### Literatur

- Gross, R., Schölmerich P. Lehrbuch der Inneren Medizin, 8. Auflage, Schattauer Verlag Stuttgart – New York 1994
- Wick G., Baudner S., Herzog F. Immunofluoreszenz Die Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg/Lahn 1976
- Friemel H. Immunologische Arbeitsmethoden Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1984
- Bittencourt, AL. Congenital Chagas disease. Am J Dis Child 1976 130:97-103.
- Koberle F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: The pathology of American trypanosomiasis In: Dawes B. (Ed) Advances in Parasitology 6:63-116 Academic Press, New York
- Hoff R. et al. *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid during the acute stage of Chagas' disease. N Eng J Med 1978 298:604.
- Cossio PM et al. Chagasic cardiomyopathy. Am J Pathol 1977 86:533
- Martini-Campos JV, Tafuri WL. Chagas' enteropathy. Gut 1973 14:910. Northeast Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1978 27:1123-1127.
- Wkly Epidem Rec WHO 1985 60:37-44.
- Cerisola JA. Immunodiagnosis of Chagas' disease: hemagglutination and immunofluorescence tests. J Parasitol. 1970 56:409-10

### Schema (siehe auch Abschnitt „Durchführung“)



## Instructions

VEUILLEZ LIRE ATTENTIVEMENT

### AntiCruzZ

(Essai pour la détection d'anticorps de la *trypanosomiase américaine*)

A usage uniquement professionnelle

#### Information générale


La trypanosomiase américaine, communément appelée maladie de Chagas était autrefois entièrement du continent américain et précisément de l'Amérique latine. Aujourd'hui elle s'est propagée à d'autres continents pour des raisons de mobilité démographique. AntiCruz est trousse confectionnée pour détecter les anticorps dans le sang des personnes souffrant de la maladie de Chagas.


#### Principe de la méthode (immunofluorescence indirecte)

L'immunofluorescence indirecte est basée sur l'utilisation successive de 2 anticorps : le premier anticorps de type monoclonal reconnaît spécifiquement la protéine d'intérêt. Le second anticorps de type polyclonal est dirigé contre l'anticorps primaire (le premier). Dans ce cas, on a deux anticorps. L'anticorps primaire est dirigé contre l'antigène recherché. Ensuite on utilise un deuxième anticorps, marqué par un fluorochrome (FITC), et possédant une haute affinité pour l'anticorps primaire (dirigé contre l'isotype de l'anticorps primaire, il s'agit alors d'une antiglobuline).

Dans cet essai d'immunofluorescence indirecte, la lame est dotée d'une coupe mince du muscle cardiaque de rat infecté du parasite *Trypanosoma cruzi* (antigène). Le sérum dilué à tester est incubé sur la lame. Une réaction chimique de liaison à la structure du tissu correspondant (antigène-anticorps) se produit si il y a des anticorps dirigés contre l'antigène de *T. cruzi* dans l'échantillon du patient. Dans une étape de lavage les composants non liés du sérum sont éliminés. Par incubation avec le deuxième anticorps conjugué avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), les anticorps liés de l'échantillon de sérum peuvent être spécifiquement marqués. Après une étape de lavage supplémentaire, la coupe de tissu est recouverte et examinée sous un microscope à fluorescence.

#### Stockage et stabilité

 Protégez de la lumière et conservez à des températures comprises entre 2-8°C

 Non ouvert les réactifs de la trousse ont une stabilité de 12 mois à compter de la date de fabrication.

#### Contenu

- Revêtu avec des champs d'antigène diapositive
- Sérum de contrôle positif, prêt à l'emploi
- Sérum de contrôle négatif, prêt à l'emploi
- FITC Ig(G, A, M)- conjugué avec Evans-Blue, prêt à l'emploi
- Milieu de montage, prêt à l'emploi.
- Papier buvard
- Dilution et du tampon de lavage

#### Ustensiles et matériaux nécessaires

- L'eau distillée
- Gants
- Creux de coloration de support de diapositives
- Crayon
- Microscope à fluorescence
- Tubes à essai pour la dilution du sérum
- Cavité d'humidité
- Lamelles couvre-objet 24 x 60

#### Préparation

Chauffer le nombre de lames, les réactifs et les sérums à la température ambiante. Préparation de la solution tampon en dissolvant complètement la totalité du contenu du sachet avec les sels de tampon PBS dans 1000 ml d'eau désionisée. Retirer les lames de l'emballage. Selon le protocole de les étiqueter de la part de mat des tranches avec un crayon et de les mettre dans la chambre humide. Préparer les sérums dans un ration de 1:10 avec du diluant (p. ex., 5 µl de sérum de 45 µl dans le tampon de dilution).

**Procédure** (voir aussi le diagramme de prochaine page)

**Au long de l'exécution des coupes de tissu ne doit pas sécher!**

**La pré-incubation:** 10 µl de tampon d'échantillon sur chaque diapositive à examiner champs, incubé pendant 10 minutes, puis retiré avec du papier absorbant.

1. Une baisse des contrôles positifs et négatifs, et 15 µl d'échantillons de patients dilués sont applicables à chaque domaine d'antigène. Faites attention à la couverture complète de la section de tissu.
2. Incube les diapositives 60 minutes à 37°C dans une chambre humide. Puis aspirez les sérums sans toucher les sections de tissu avec du papier buvard.
3. Placez les diapositives dans le support et plongez brièvement une fois dans le tampon creux remplis de coloration. Remplacez le tampon, puis lavez deux fois pendant 5 minutes chacun et sortez du titulaire.
4. Sèche les diapositives entre l'antigène-champs et 25-50 µl l'antigène domaine de solution prête-FITC appliquée (assurer une couverture complète).
5. Incuber les diapositives pendant 30 minutes à 37°C dans une chambre humide. Lavage ensuite comme indiqué au point 3.
6. Retirer les diapositives de la cuve, éliminer la solution de l'excès de tampon 2 gouttes de milieu de montage à chaque diapositive et remplacer le verre de couverture sans endommager la section de tissu sans bulles d'air.
7. L'évaluation est effectuée au grossissement 400 fois sous un microscope à fluorescence.

#### **Objectif d'évaluation**

1. Le résultat est négatif quand il n'y a pas ou une faible coloration de fond fluorescent peut être vu. En raison de contre-coloration du tissu est coloré faiblement rougeâtre.
2. Lire les diapositives de moins d'une heure. Si les lames sont conservés au réfrigérateur dans une chambre humide, ils peuvent être lus dans les 24 heures. Laissez diapositives réfrigérés à la température ambiante avant d'effectuer la lecture.
3. Les diapositives doivent être examinés au grossissement total de 400x.
4. Un séchage peut déranger les organismes les plus périphériquement situé dans le puits, ce qui explique pourquoi vous devriez ignorer les réponses de ces organismes.
5. La réaction ne doit être considéré comme positif si la majorité (>80%) des parasites dans le puits montrent une homogène surface fluorescence distincte.
6. L'intensité de la réaction colorée de cellules individuelles ou des pseudo-kystes peut varier, bien

que le degré de coloration basée sur l'aspect général de l'antigène.

Si un énoncé quantitatif nécessaire pour un résultat positif, le sérum doit être titré.

#### **Précautions**

Parce que les réactifs contiennent de l'azote de sodium comme agent de conservation, contact avec la peau doit être évité. Les sérums inclus dans le kit ont été testés comme anticorps HBsAg et séronégatifs. Néanmoins, ils doivent être traités comme potentiellement infectieux et les mesures de sécurité habituelles en laboratoire devraient être effectués.

#### **Littérature**

1. **Gross, R., Schölicher P.** Lehrbuch der Inneren Medizin, 8. Auflage, Schattauer Verlag Stuttgart – New York 1994
2. **Wick G., Baudner S., Herzog F.** Immunofluoreszenz Die Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg/Lahn 1976
3. **Friemel H.** Immunologische Arbeitsmethoden Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1984
4. **Bittencourt, AL.** Congenital Chagas disease. Am J Dis Child 1976 130:97-103.
5. **Koberle F.** Chagas' disease and Chagas' syndromes: The pathology of American trypanosomiasis In: Dawes B. (Ed) Advances in Parasitology 6:63-116 Academic Press, New York
6. **Hoff R. et al.** *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid during the acute stage of Chagas' disease. N Eng J Med 1978 298:604.
7. **Cossio PM et al.** Chagasic cardiomyopathy. Am J Pathol 1977 86:533
8. **Martini-Campos JV, Tafuri WL.** Chagas' enteropathy. Gut 1973 14:910. Northeast Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1978 27:1123-1127.
9. Wkly Epidem Rec WHO 1985 60:37-44.
10. **Cerisola JA.** Immunodiagnosis of Chagas' disease: hemagglutination and immunofluorescence tests. J Parasitol. 1970 56:409-10

Diagramme (lire aussi le chapitre «procédure»)

