

ImmunoComb

AVIAN CHLAMYDOPHILA PSITTACI ANTIBODY TEST KIT

Teste para Detecção de Anticorpos anti-*Chlamydophila psittaci* em aves

INSTRUÇÕES DE USO

USO VETERINÁRIO

Nº Cat. do Produto: 50ACP301/50ACP310

PRODUTO IMPORTADO



Proprietário e Fabricante: Biogal Galed Laboratories Asc. Ltd., Galed, 1924000 Israel
Tel: 972-4-9898605 / Fax: 972-4-9898690

Representante Exclusivo no Brasil, Importador e Distribuidor: JMR TRADING LTDA

CNPJ 11.857.347/0001-71

Rua Santa Alves Petra, 173 - Pinhais - Paraná-Brasil

Fone/Fax: (41)3779-2130 e-mail: info@vpdiagnostico.com.br

Responsável Técnica: Dra. Margareth Carvalho S. Agottani CRMV PR nº 3288

SAC info@vpdiagnostico.com.br

www.vpdiagnostico.com.br

I. FINALIDADE DO KIT

O kit de teste Avian *Chlamydophila psittaci* foi projetado para a detecção no sangue ou soro das aves, de anticorpos séricos anti-*C. psittaci* (doravante referida como ACP). O kit pode ser utilizado em instalações com capacidade limitada para testes de laboratório e ajudar no diagnóstico de casos clínicos

II. O QUE É O TESTE IMMUNOCOMB?

O ImmunoComb é um teste de ELISA modificado, altamente sensível, que pode ser denominado como ensaio enzimático denominada "teste do ponto", que detecta os níveis de anticorpo no plasma, soro ou sangue total.

O kit de teste ImmunoComb contém todos os reagentes necessários para desenvolver o teste. Os resultados são obtidos dentro de 60-120 minutos..

III. INFORMAÇÕES GERAIS

Chlamydophila psittaci é uma bactéria que infecta muitas espécies de aves e pode ser transmitida aos seres humanos, causando uma doença geralmente conhecida como Chlamydiosis. Esta doença também é referida como psitacose ("Febre do papagaio") em papagaios e outras aves psitacídeas e ornithose em galinhas e perus. As pessoas que manuseiam ou estão expostas a aves infectadas estão em maior risco de contrair psitacose por *C. psittaci*, que normalmente é transmitida por via aérea. A detecção de anticorpos pode ajudar no diagnóstico.

IV. COMO FUNCIONA O IMMUNOCOMB?

■ Com base no princípio de imunoensaio em fase sólida, o ImmunoComb é um cartão

de plástico em forma de um pente, em que o antígeno purificado de *Chlamydophila psittaci* está adsorvido em um ponto.

■ As amostras (discos de papel saturados com sangue, plasma / soro) são depositadas em poços separados, na fileira A da Placa Reveladora.

■ Amostras de Controle Positivo e de Controle Negativo, fornecidos no kit, devem ser aplicadas em poços separados na linha A.

■ O Pente é inserido no poço de amostra, de modo que, anticorpos da amostra ligam-se aos antígenos nos pontos dos dentes do pente.

■ Cada placa pode ser usada para testar individual ou qualquer número de amostras até 10, destacando o número desejado de dentes do pente e utilizando a coluna correspondente de poços na placa de desenvolvimento. Cada execução deve incluir Controle Positivo e Controle Negativo.

■ Os anticorpos não ligados são lavados na segunda fila.

■ A próxima linha contém anticorpo anti-IgG de papagaios, marcado com uma enzima. Enquanto o pente está imerso neste "conjugado", os anticorpos IgG ligados serão marcados.

■ Após outra etapa de lavagem, o pente é inserido em uma fila onde ocorre a reação enzimática. Isto gera mudança de cor, a sua intensidade, indicará a quantidade de anticorpos presentes em cada amostra.

■ A intensidade da cor cinzento-roxo, obtidas nos pontos mais baixos, devem ser convertidos para os níveis de anticorpos, usando o CombScale. Os pontos de Controle Interno indicam que o teste foi válido.

V. SINAIS CLÍNICOS

Aves infectadas, podem apresentar uma série de sinais clínicos, de inaparente a doença grave, principalmente no trato respiratório. O pássaro doente parece "debilitado" e apresenta secreção ocular, nasal, com ou sem diarreia.

As *Chlamyophilas* são eliminadas através das vias, oral, ocular, secreções respiratórias e fezes. Tanto aves infectadas como aparentemente saudáveis, são capazes de eliminar *Chlamyphila*. No entanto, a eliminação pode ser intermitente, portanto, um resultado negativo do exame de fezes ou swab cloacal nem sempre exclui a possibilidade de que uma ave pode estar infectada.

VI. DIAGNÓSTICO

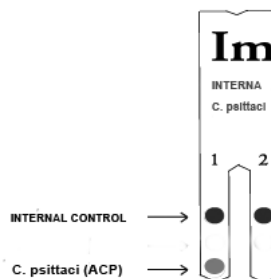
Uma série de ensaios específicos são atualmente utilizados para o diagnóstico de infecção por *C. psittaci* em aves. Os testes dividem-se em duas categorias:

1. Detecção do antígeno nas secreções corporais, fezes ou swabs cloacais: Os métodos incluem a imunofluorescência direta, PCR e cultura. As principais limitações destes métodos são falsos negativos, devido aparecimento intermitente dos organismos e a exigência de laboratórios especializados e experiência para realizar os testes.

2. Avaliação de anticorpos anti-*Chlamyphila* no sangue de aves incluem: Técnicas de fixação do complemento, a aglutinação rápida e o teste de ELISA, que inclui o ImmunoComb. Estes métodos sorológicos, oferecem a vantagem de serem capazes de identificar uma ave infectada que não esteja eliminando organismos. Todos os

métodos à exceção do ImmunoComb, são realizados por laboratórios especializados

Fig. 1: Teste com dois dentes



VII. ESTOCAGEM E MANUSEIO

1. Armazenar o kit sob refrigeração normal (2 - 8 °C). Não congelar o kit.
2. Antes de realizar o teste manter todos os elementos do kit e amostras à temperatura ambiente, de preferência por 60 - 120 minutos (ou apenas incubar a placa) durante 22 minutos a 37 °C. Realizar ensaio à temperatura ambiente de 20 - 25 °C
3. Evite derramamento e contaminação cruzada de soluções.
4. Misturar os reagentes agitando suavemente a placa várias vezes antes do uso.
5. Não misturar reagentes de diferentes kits ou de diferentes compartimentos do mesmo kit.
6. Não toque nos dentes do cartão ImmunoComb.
7. Quando se utiliza a placa, perfure a tampa de cada compartimento de acordo com as instruções do procedimento de teste. Não retire a proteção de alumínio.
8. O kit contém material biológico inativado. O kit deve ser manuseado e eliminado de acordo com as exigências sanitárias local.

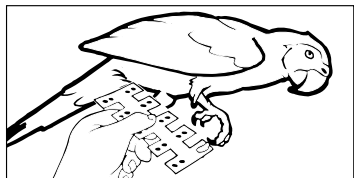
VIII. TÉCNICA PASSO A PASSO

Preferencialmente realizar o teste em sala com temperatura entre 20-25° C.

Misturar os reagentes agitando suavemente a placa várias vezes antes do uso.

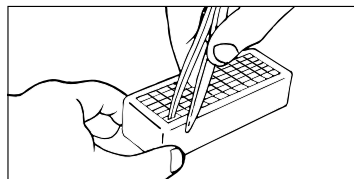
Antes de realizar o teste, manter todos os elementos do kit e amostras à temperatura ambiente, por 60-120 minutos ou incubar somente a placa, durante 20 minutos a 37 °C.

(1) Coletar sangue do pássaro



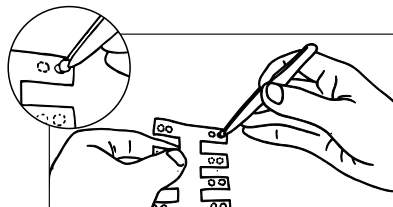
(2) Ao utilizar um disco de papel, corte cuidadosamente uma das unhas do pé da ave. Tomar uma amostra de papel e saturar um disco com o sangue **em ambos** os lados do disco.

(3) Usar a pinça para perfurar a tampa de alumínio de proteção de linha A. Um poço para cada amostra



Não abra qualquer cavidade da linha A ou outras linhas que você não pretenda usar

(4) Destacar um disco saturado com sangue. **O sangue deve estar seco.**



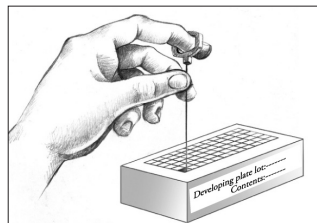
(5) Inserir o disco no poço da fileira A. Mergulhar totalmente no reagente líquido. Proceder igual com as outras amostras nos próximos poços.



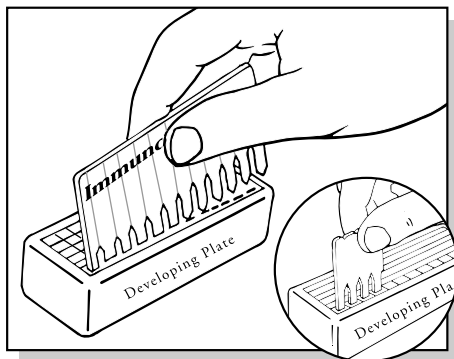
Incubar disco no poço A durante 60 minutos à temperatura ambiente para permitir a extração do anticorpo

Ao usar amostras de soro / plasma: passos **2, 4 e 5** devem ser ignorados. Pipetar **5 uL** de soro / plasma das amostras nos poços (s) da linha A, utilizando uma pipeta ou um tubo capilar. Levantar e abaixar o embolo da pipeta / pistão várias vezes para conseguir boa mistura. **Siga para a etapa 6.**

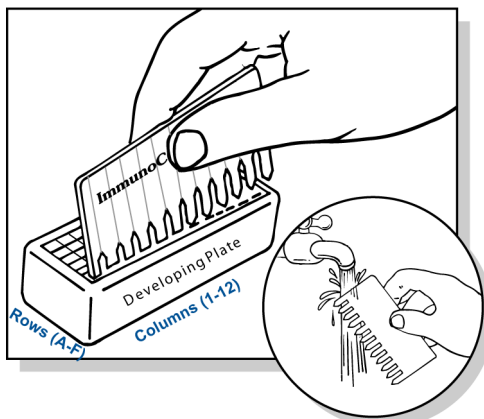
(6) Abra os próximos dois poços consecutivos para os **soros de controle**. Tome 5uL soro Controle Positivo (C +) e insira em um poço ao lado da última amostra. Misture o soro no poço. **Faça o mesmo com o soro Controle Negativo (C-) no poço seguinte.**



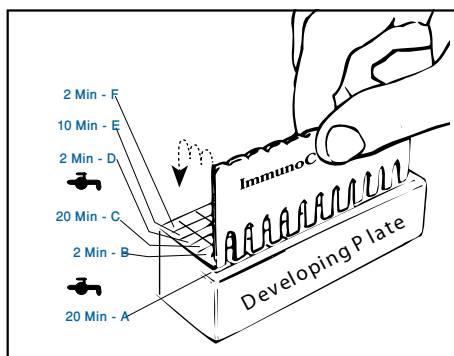
(7) Retirar o pente de seu envelope de proteção. Para testar menos de 12 amostras, cortar ou romper o pente por dobragem, nos entalhes para o número de testes necessários. Inserir o Pente no poço aberto (s) na **linha A** (o lado impresso de frente para você) e incubar por **20 minutos**. Para melhorar a mistura, mergulhe suavemente **para cima e para baixo** o pente, no início de cada incubação (isto em todas as linhas). Repetir este movimento, pelo menos, duas vezes em todas as linhas restantes.



(8) Use uma pinça para perfurar o alumínio do próximo poço (**linha B**). **Lave o pente sob a água fria da torneira** e introduza na **linha B** por **2 minutos**. Antes de transferir o pente para a próxima linha, perfurar a folha dos poços necessários da **linha C**. Suavemente bata a ponta do pente sobre papel absorvente para retirar o excesso de líquido dos dentes do pente. Inserir o pente no poço da **linha C** durante **20 minutos**. Use uma pinça para perfurar o alumínio do poço seguinte. (**Linha D**). **Lave o pente sob a água fria da torneira** e introduza na linha **D** por **2 minutos**. Perfurar o alumínio da próxima linha (**E**). Retirar o excesso de líquido dos dentes do pente e inserir na **linha E** durante **10 minutos**.



(9) Perfurar o alumínio da (**linha F**). Após a conclusão do desenvolvimento da cor na **linha E**, mova para a **linha F** por **2 minutos** para fixação da cor. Retirar o excesso de líquido e deixe secar por 1-10 minutos. Não secar com papel



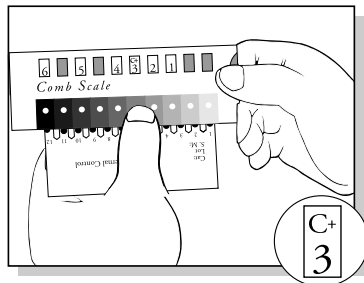
IX. LEITURA E INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO

- Leia os resultados dos testes imediatamente. Durante a leitura desta seção referem-se ao exemplo de um pente desenvolvido na tabela página 7.
- O ponto inferior do pente é PONTO do resultado da *Chlamydophila psittaci*. Avaliar os resultados de cada ponto separadamente.
- O nível de IgG de *C. psittaci* é determinado por comparação da intensidade da cor de cada amostra com a intensidade da cor do controle positivo (C+).
- A intensidade da tonalidade cinza nos pontos de ensaio é pontuado numa escala de 1 a 6, por comparação da cor com o Controle Positivo, que é classificado como C+3 com uma escala de cor (CombScale - ver seção X).
- Os resultados com a intensidade da cor idêntica ou superior do que o controle positivo são pontuados $\geq S3$, o que indica maior título de anticorpos. Os resultados marcados como S2 são considerados positivos. Resultados marcados <2 e >1 são considerados inconclusivos.
- Diferentes espécies de aves podem apresentar sensibilidades diferentes neste ensaio. Um resultado positivo baixo pode não ser significativo em espécies de aves mais sensíveis e vice-versa. Para obter informações detalhadas sobre as espécies e seu grau de sensibilidade, por favor consulte o nosso site (www.biogal.co.il ou www.vpdiagnostico.com.br) para obter informações do produto.
- O Controle Negativo consiste de soros não-imunes e deve ser lido como zero (S = 0). As amostras com nenhuma cor ou apenas um traço de roxo-cinza são marcados como S0 e S1 e são considerados negativas. Na seção X você encontrará exemplo de um pente com as reações e a interpretação dos resultados.
- O Pente seco pode ser mantido como registro.

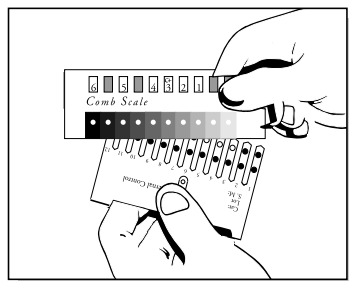
X. LEITURA COM A COMBSCALE

Quando o pente estiver completamente seco, alinhá-lo com o CombScale fornecido no kit. Encontrar o tom de roxo-cinza no CombScale que mais se aproxima do ponto de **Referência Positiva** (ponto superior). Deslize a régua amarela até a marca C+ aparecer na janela, acima da cor que você encontrou.

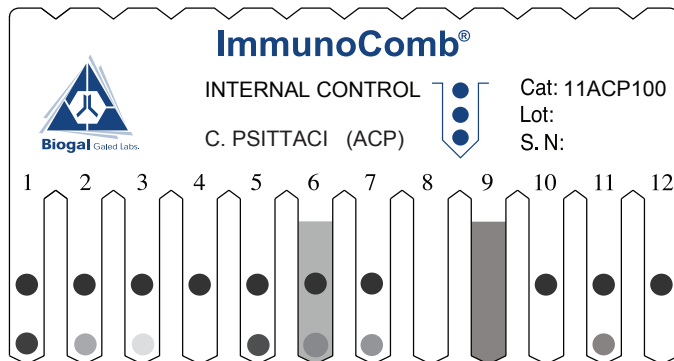
Segure a régua nesta posição durante toda a leitura. Este passo realmente calibra a C+ à S3, que é o ponto de “cut-off”, que os pontos de teste serão comparados.



Enquanto mantém a régua fixa, encontrar o tom de roxo-cinza no CombScale que mais se aproxima do **resultado do teste** desejado (um dos pontos mais baixos). O número que aparece na janela acima é a pontuação CombScale (S0-S6). Repita este passo com cada ponto de teste em separado.



XI. EXEMPLO DE TESTE



DENTE No.	RESULTADOS	OBSERVAÇÕES
1, 5	Reação forte positiva para <i>C. psittaci</i>	>S3
2, 7	Reação positiva para <i>C. psittaci</i>	≥ S2
3	Reação fraca para <i>C. psittaci</i>	S1-2 Inconclusivo - Considerado suspeito
4,10	Reação negativa para <i>C. psittaci</i>	Negativo <S1
6	Forte background com reação positiva	ACP positivo
8	Controle do teste sem reação	Teste inválido
9	Forte background - sem reação	Teste inválido
11	Controle positivo	S 3
12	Controle negativo	S 0

Outra forma de ler os resultados é usando o CombScan. É um programa de software que utiliza um computador e um escaner compatível com TWAIN. Quando é colocado o pente no escaner, o programa traduz os resultados da cor em valores numéricos. O CombScan além dos resultados, armazena os dados. É fornecido gratuitamente, mediante solicitação.

Tal como acontece com todos os testes de diagnóstico, um diagnóstico clínico definitivo não deve ser baseado inteiramente nos resultados sorológicos, mas também achados clínicos do Médico Veterinário.

Para auxílio adicional contatar:

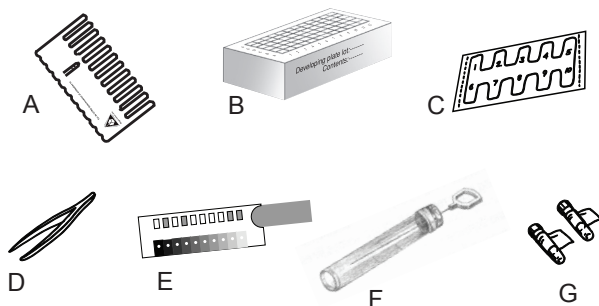
Distribuidor local pelo telefone/fax: (41)3779-2130

e-mail: info@vpdiagnostico.com.br - website: www.vpdiagnostico.com.br

Fabricante: Laboratórios da Biogal Galed pelo telefone: 972-4-9898605 / Fax: 972-4-9898690

e-mail: info@biogal.co.il - website: www.biogal.co.il

XII. COMPONENTES DO KIT



Component	Kit para 10 testes Cat. 50AC301	Kit para 100 testes Cat. 50ACP310
A. Cartão ImmunoComb (embalado em alumínio)	1	10
B. Placa para o desenvolvimento do teste	1	10
C. Discos de papel	1	10
D. Pinça	1	1
E. CombScale	1	1
F. Tubo capilar com 12 unidades e pistão	1	Pode ser adquirido mediante solicitação
G. Soros Controle Negativo e Positivo	1	1
Instruções de uso	1	1

XIII. REFERÊNCIAS

- Bendheim et al. (1994). Proceedings of Deutsch Veterinarmedizinische Gesellschaft, Munchen, Germany.
- Lublin et al. (1997). The 4th Conference of the European Committee of the Association of Avian Veterinarians, May, London, England.
- Morales et al. (2007). Proceedings of the 12th International Conference of the Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine (AITVM), Montpellier, France, 20-22 August, 2007. Does control of animal infectious risks offer a new international perspective?
- Phalen et al. (1999). Proceedings: Birds and all that Jazz. 20th Annual Conference and Expo, September, New Orleans, Louisiana, USA.
- Phalen D. N. (2001). Seminars in Avian & Exotic *Pet Medicine*, **10** (2), 77-89.