

# *ImmunoComb*

## **Canine *Brucella Ab. Test Kit***

Teste para Detecção de Anticorpos IgG de  
*Brucella canis* em caninos

**Biogal**

**Proprietário e Fabricante:** Biogal Galed Laboratories, Galed, 19240 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

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

SAC [info@vpdiagnostico.com.br](mailto:info@vpdiagnostico.com.br)

[www.vpdiagnostico.com.br](http://www.vpdiagnostico.com.br)

## I. FINALIDADE DO KIT

O kit Canine *Brucella* Ab Test, foi projetado para determinar, no soro de cães, o título do anticorpo IgG contra *Brucella canis*.

## II. INFORMAÇÕES GERAIS

A Brucelose canina é causada por *Brucella canis*. Foi isolada de cães em 1966 como causa de aborto e esterilidade em machos. Os cães e outras espécies caninas, são reconhecidas como os únicos hospedeiros.

As infecções naturais ocorrem depois da ingestão de materiais placentários, fetos abortados, descargas vaginais de cadelas em cio.

Após aborto, as fêmeas podem eliminar a *Brucella canis* por várias semanas ou em forma intermitente por meses e machos contaminados, através da urina, quando contem fluídos seminais ou prostáticos. Os sinais clínicos estão relacionados ao trato reprodutivo.

Fêmeas: aborto após 45-55 dias de gestação na grande maioria dos casos. Pode também ocorrer morte embrionária, reabsorção ou aborto 10-20 dias após cobertura.

Machos: epididimite unilateral ou bilateral e infertilidade

## III. QUE É O TESTE IMMUNOCOMB?

O teste ImmunoComb é um kit de ELISA portátil. É um teste sensível que detecta níveis de anticorpos no soro. Os resultados da IgG anti-*Brucella canis*, contida no sangue do paciente canino, são obtidos em torno de 20 minutos.

## IV. COMO FUNCIONA O IMMUNOCOMB?

- O Kit contém 2 componentes principais: um cartão de plástico em forma de pente, a seguir designado o Pente e um multi compartimento, a placa de desenvolvimento.
- O Pente tem 12 dentes suficientes para 12 testes. Cada dente será utilizado em uma coluna correspondente de poços, na placa de desenvolvimento. Amostras individuais ou múltiplas podem ser testadas, basta destacar a quantidade desejada de dentes do pente.
- Antígenos da *Brucella rugosa* purificados, estão adsorvidos em um ponto na parte inferior de cada dente do pente. O ponto superior é a referência positiva. (Pág 7)
- A primeira etapa do ensaio é depositar amostra de soro ou plasma, no poço da linha A da placa de desenvolvimento.
- Em seguida, o pente é inserido no poço, já com a amostra e transferidos para os poços restantes (B-F), em intervalos de tempo informados na instruções passo a passo (ver pag.4). Os anticorpos IgG específicos da espécie, se presentes, ligam-se aos antígenos adsorvidos em pontos do dente.
- O pente é transferido para o poço seguinte (linha B) em que os anticorpos não ligados são lavados.
- O pente é inserido no poço seguinte (linha C), que contém enzima marcada anti-anticorpos IgG de canino, que ligam-se aos complexos antígeno-anticorpo .
- Após mais duas lavagens (linhas D & E), o pente é movido para o poço seguinte (linha F), ocorre o desenvolvimento de cor através de uma reação enzimática.

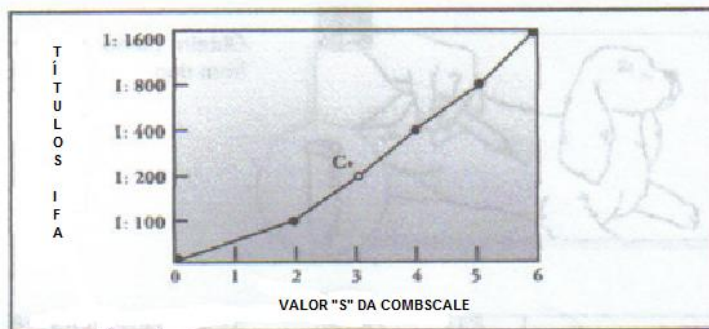
- A intensidade do resultado de cor corresponde diretamente ao nível de anticorpos da amostra. Os resultados são registrados com o ponto de referência positivo e CombScale.

## VI. DIAGNÓSTICO

Várias técnicas diferentes para o diagnóstico sorológico de *Brucella canis*, vem sendo desenvolvidas através dos anos, desde seu isolamento em 1966, porém todas apresentam problemas no diagnóstico, devido aos antígenos presentes na bactéria, os quais podem reacionar com anticorpos produzidos por outras bactérias. O diagnóstico por PCR, quando positivo, temos 100% de certeza, porém quando negativo e a amostra é sangue, o resultado é duvidoso, pois nem sempre a bactéria está localizada na corrente sanguínea. Os cães positivos na sorologia, com ou sem sintomas, pode-se coletar sangue para hemocultivo, porém devemos lembrar que cães podem apresentar reação sorológica positiva por muito tempo após eliminar a *Brucella canis* e a *Brucella* pode não se encontrar na corrente sanguínea.

O teste ImmunoComb é constituído de antígeno purificado de *Brucella* e conjugado anti IgG de cão, o que elimina a grande maioria de resultados falsos positivo.

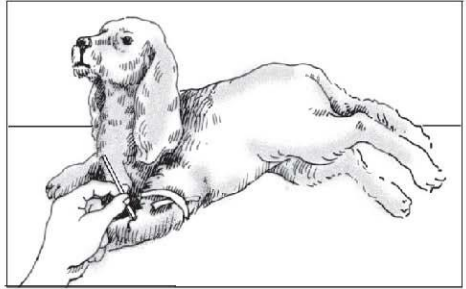
FIG.1:RELAÇÃO ENTRE VALORES DO TESTE IMMUNOCOMB CANINE BRUCELLA E VALOR "S" DA IMUNOFLUORESCÊNCIA



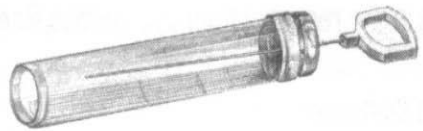
## VII. PROCEDIMENTO PASSO A PASSO

1. Realizar o teste preferencialmente em sala com temperatura entre 20-25 °C.
2. Deixar todos os ingredientes do kit por 60-120 minutos a temperatura ambiente ou somente a placa por 22 minutos a 37 °C.
3. Homogeneizar delicadamente a placa de desenvolvimento em movimentos basculantes.

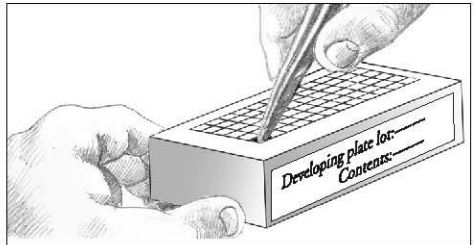
(1) Obter a amostra do sangue do paciente.



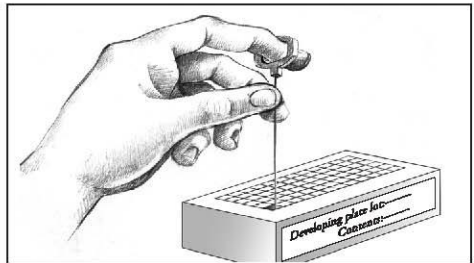
(2) Usar uma pipeta ou tubo capilar \*. Para amostra de sangue total pipetar 10 µL. Para testar o soro / plasma usar 5 µL.



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



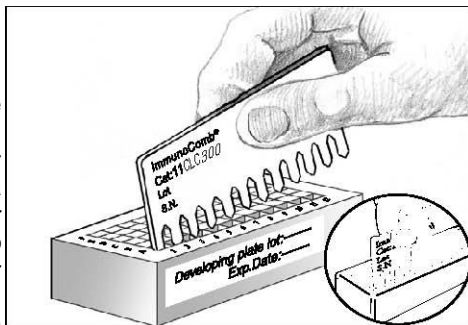
(4) Depositar uma amostra na cavidade da fileira A. Levantar e abaixar o pistão da pipeta/tubo capilar, várias vezes para homogeneizar a amostra e o diluente do poço.



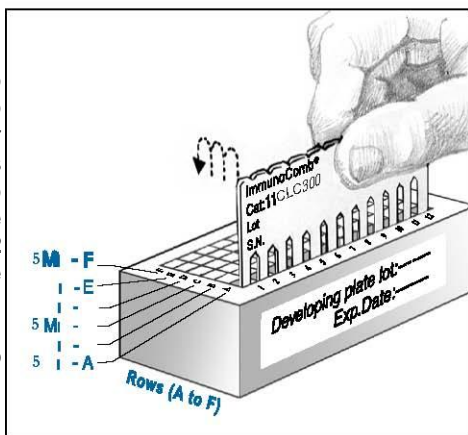
Não abra qualquer cavidade da fileira A ou de outras linhas que você não pretenda usar.

\* Unidade de 40 tubos capilares e um pistão podem ser adquiridos mediante solicitação

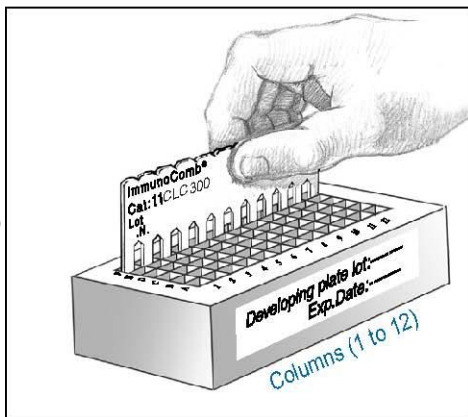
(5) Retire o pente de seu envelope de proteção. Para testar menos do que 12 amostras, cortar ou romper o pente por dobragem nos entalhes, para a quantidade de testes necessários. Inserir o Pente no poço aberto na **linha A** (o lado impresso de frente para você) e incubar por **5 minutos**. Para melhorar a mistura, mergulhe suavemente **para cima e para baixo** o pente, no início de cada incubação. Repetir este movimento, pelo menos, duas vezes até terminar o tempo.



(6) Antes de transferir o pente de um poço para outro, perfure o alumínio do poço seguinte usando a pinça. Retirar suavemente o excesso de líquido dos dentes do pente batendo com a ponta do dente em um papel absorvente, e encaixe o pente, no poço (**linha B**) durante **2 minutos**. Inserir o pente no poço seguinte (**linha C**) durante **5 minutos**. E nas cavidades restantes (**linha D & E**), durante **2 minutos** cada e o último poço (**linha F**) durante **5 minutos**.



(7) Para fixar a cor retorne o pente para o poço **E** por **2 minutos**. Retire o pente e deixar secar entre 1-10 minutos. **NÃO SEQUE COM PAPEL.**



## VIII. LEITURA E INTERPRETAÇÃO IgG

- O ponto mais superior é o local de referência positiva e deve ter cor roxo-cinza. Esta é a mesma tonalidade de cor que é gerada por uma resposta de IgG positiva significativa. Este ponto deve ser lido como S3 numa escala de S0 a S6. (S3 é considerado o nível de "cut-off" de anticorpos IgG, que é aproximadamente equivalente a uma resposta imunológica positiva com um título de 1:200 no teste Imunofluorescência (IFA). Veja a figura. 1.
- O ponto inferior do dente dá o título de anticorpos IgG anti-*Brucella canis*, na amostra testada. Compare a tonalidade deste ponto (inferior) com o ponto de referência positiva (superior). Uma tonalidade visivelmente mais escura do ponto inferior (*Brucella canis*), em relação ao ponto Referência positiva, indica uma resposta positiva. Tonalidade mais fraca do que a cor de Referência positiva indica um título baixo.
- Para avaliar a pontuação de anticorpos, utilize o CombScale fornecido no kit.

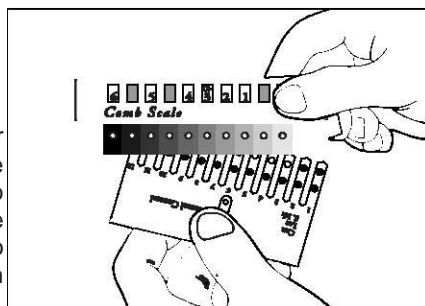
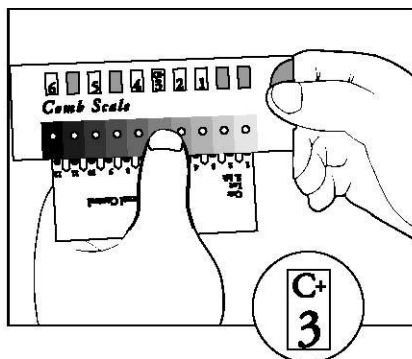
## IX. LEITURA COM O COMBSCALE

O valor CombScale **S** é o número que aparece na janela amarela correspondente ao tom da cor, do ponto referência positiva, que é calibrada em S3.

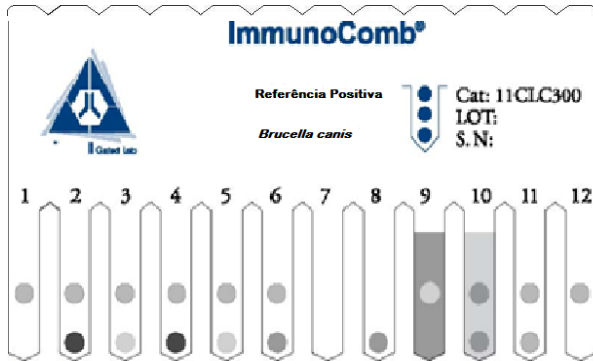
Quando o pente estiver completamente seco, alinhá-lo com o CombScale fornecido no kit. Encontrar o tom de roxo-cinza no CombScale que mais se aproxima do ponto de referência positiva (ponto superior). Deslize a régua amarela até a marca C+ aparecer na janela, acima da cor que você encontrou.

Segure a régua nesta posição durante toda a leitura. Este ponto 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 ponto do resultado do teste. (o ponto inferior). O número que aparece na janela acima é a pontuação CombScale (S0-S6). Repita este passo com cada ponto de teste separadamente.



Outra forma de ler os resultados é usando o CombScan. É um programa de software que utiliza um computador e um scanner compatível com TWAIN. Quando é colocado um pente no digitalizador, o programa traduz os resultados de cor, em valores numéricos. O CombScan auxilia os Laboratórios na leitura dos resultados do kit ImmunoComb e conserva os dados. É fornecido gratuitamente, mediante solicitação.



Dente nº	Resultados	
1	S0	Reação negativa para <i>Brucella canis</i> .
2	≥S5	Reação fortemente positiva para <i>Brucella canis</i> .
3	S1-2	Reação fraca positiva para <i>Brucella canis</i> .
4	≥S5	Reação fortemente positiva para <i>Brucella canis</i> .
5	S1-2	Reação fraca positiva para <i>Brucella canis</i> .
6	≥S3	Reação positiva para <i>Brucella canis</i> .
7*		Teste inválido.
8*		Teste inválido.
9**		Teste inválido.
10***	≥S3	Reação positiva para <i>Brucella canis</i> .
11	≥S3	Reação positiva para <i>Brucella canis</i> .
12	S0	Reação negativa para <i>Brucella canis</i> .

**Remarks:**

\*O ponto Referência positiva não reagiu. Repetir o teste. \*\* Background forte. Repetir o teste. \*\*\* Background alto porém aparecem as reações.

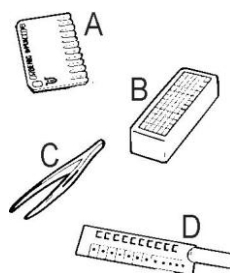
**X. EXAMPLE OF A DEVELOPED COMB**

## XI. 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 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 o desenvolvimento de 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.

## XII. COMPONENTES DO KIT

Componentes	Embalagem com 12 testes (50CLC201)	Embalagem com 120 testes (50CLC210)
A. Cartão ImmunoComb	1	10
B. Placa Reveladora	1	10
C. Pinça de Plastico	1	1
D. Escala de cores CombScale	1	1
E. Tubo capilar com 12 tubes & um pistão	1	. Incluído caso solicitado
F. Instruções de uso	1	1



## XIII. REFERÊNCIAS

Para maiores informações contatar nosso distribuidor local JMRT Trading Ltda, e-mail [info@jmrtrading.com.br](mailto:info@jmrtrading.com.br), ou Biogal Galed Laboratories directly by E-mail:

[info@biogal.co.il](mailto:info@biogal.co.il) or by tel: 972-4-9898605 / fax: 972-4-9898690.

**Biogal's**  
**ImmunoComb**