

ImmunoComb

CANINE EHRlichIA

Kit para a detecção de anticorpos IgG de Ehrlichia canis

Instruções de Uso

USO VETERINÁRIO - PRODUTO IMPORTADO

Nº Cat. do Produto: 50CEH201/50CEH210



Proprietário e Fabricante:

Biogal Galed Laboratories Acs. 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 Mandaguari, 1752 - Pinhais - Paraná-Brasil

Registrado no Ministério da Agricultura sob nº 9424/ 2008

Fone: (41)37792130 / 988178372 e-mail: info@vpdiagnostico.com.br

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

SAC: info@vpdiagnostico.com.br www.vpdiagnostico.com.br

I. FINALIDADE DO KIT

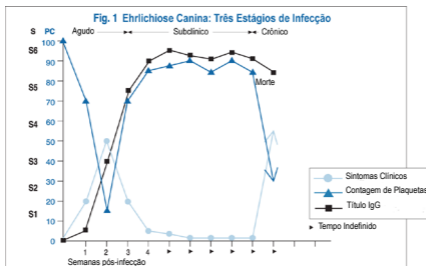
O kit para detecção de anticorpos IgG ImmunoComb Canine Ehrlichia, tem a finalidade de determinar no soro ou sangue de cães, o título do anticorpo IgG anti- *Ehrlichia canis*.

II. INFORMAÇÕES GERAIS

Ehrlichiose é uma infecção sangüínea que ocorre em cães. Causa endotoxemia, progressiva pancitopenia, epistaxe e marcada trombocitopenia. A ehrlichiose canina é causada por uma bactéria gram negativa de parasitismo intracelular, do grupo das rickettsias, denominada *Ehrlichia canis*, transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. A ehrlichiose canina tem sido diagnosticada em todo mundo. Há casos relatados na América, Europa, Ásia e África. A incidência da doença está relacionada à distribuição do vetor. Há uma variação considerável no tipo, severidade e duração de manifestação clínica da doença, que pode ser denominada freqüentemente como "Febre do carrapato" e mais recentemente, vem sendo denominada de "Pancitopenia Tropical".

Sinais Clínicos:

O curso da doença é delineado em três estágios:



1º estágio agudo: O estágio inicial ou agudo da infecção inclui os sinais clínicos inespecíficos que podem ser suaves e podendo passar despercebidos pelo proprietário do cão. Alguns cães apresentam apetite diminuído, febre e letargia. Ao exame clínico, o veterinário pode detectar linfadenopatias e esplenomegalia.

O decréscimo na contagem de plaquetas é o achado hematológico mais consistente. Se deixado sem tratamento, a maior parte dos cães pode sair deste estágio. Aqueles animais que não eliminaram a rickettsia do organismo podem entrar no segundo estágio da infecção.

2º estágio subclínico: Pode perdurar por um período indefinido. O tratamento correto neste estágio, especialmente em animais de alto risco, é importante, a fim de impedir o progresso da doença.

3º estágio crônico: Não está claro por que os animais passam do estágio subclínico para o estágio crônico de Ehrlichiose. É sabido, entretanto, que depois de alcançado este estágio o tratamento é ineficaz. Os sinais clínicos da Ehrlichiose crônica incluem: letargia, febre, inapetência, perda de peso, tendência a sangramento e finalmente morte.

III. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de Ehrlichiose canina é baseado nos sinais clínicos durante os estágios agudos e crônicos. Apesar da diminuição das plaquetas no teste hematológico ser um achado bastante importante, o teste imunológico é o método preferido para a confirmação da enfermidade, especialmente durante o 2º estágio da doença, quando não há manifestações clínicas nem hematológicas.

IV. O QUE É O TESTE IMMUNOCOMB?

O teste ImmunoComb é uma modificação do teste de ELISA e pode ser denominado também como “o teste do ponto”. Ao invés do antígeno estar adsorvido no fundo do poço de uma placa, está adsorvido em um ponto do dente de um cartão plástico (cartão ImmunoComb). O teste ImmunoComb detecta níveis de anticorpo IgG no soro. O kit contém todos os reagentes necessários para desenvolvimento do teste. O resultado é obtido dentro de 23 minutos.

V. COMO FUNCIONA O IMMUNOCOMB?

■ Baseado no princípio Imunoensaio em fase sólida, o ImmunoComb é um cartão de plástico com formato de um pente, impregnado por antígenos purificados de *Ehrlichia canis*.

O kit contém 2 componentes principais: 1 pente (ImmunoComb) de plástico e 1 placa reveladora.

■ O pente é inserido nos orifícios da primeira fileira (A), de forma que, os anticorpos das amostras liguem-se aos antígenos no pente. Os anticorpos que não se ligarem aos antígenos serão lavados na segunda fileira (B).

- A terceira fileira (C) contém anticorpos anti-IgG canino marcados por uma enzima. Os anticorpos que se ligaram ao cartão serão marcados.
- Após 2 estágios (D,E) de lavagem, o pente é inserido na fileira (F) onde ocorre a reação enzimática. Isso provocará uma mudança de cor que indica a quantidade de anticorpos presentes.
- Através da escala de tons cinza, é realizada a interpretação da intensidade do tom no ponto inferior do pente, relativo ao nível de imunoglobulina IgG anti-*Ehrlichia canis*, comparando-se com o controle positivo de referência, localizado no ponto superior do pente.

VI. EXPLICAÇÃO PASSO A PASSO DO TESTE: MANUSEIO E USO:

- **Para melhores resultados realizar o teste em temperatura entre 20-25°C.**
- Armazenar o kit sob refrigeração normal de 2°C a 8°C. Não congelar!
- Não misturar reagente proveniente de kits ou diferentes poços da placa reveladora.
- Não tocar nos dentes do cartão ImmunoComb ao retirar da embalagem ou ao destacar os dentes para o teste. Ao utilizar a placa reveladora, perfurar a cobertura de alumínio de cada poço, obedecendo às instruções de procedimento do teste. Não remover ou rasgar a cobertura de alumínio de uma só vez.
- Não remover e sim perfurar o alumínio somente dos poços suficientes para o teste.

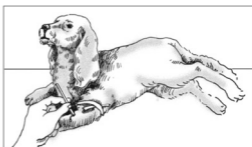
TÉCNICA

OBS.: 1 - Pipeta e ponteiros não são incluídas nos kits com 120 testes.

Antes de realizar o teste, manter todos os componentes do kit e as amostras a temperatura ambiente (20° a 25°C), por 60 minutos.

Homogeneizar delicadamente os reagentes invertendo a placa reveladora várias vezes antes do uso.

(1) Obter uma amostra de sangue do cão. Pode ser sangue sem anticoagulante para obtenção de soro. Caso testar com sangue total, coletar amostra com EDTA ou Heparina.



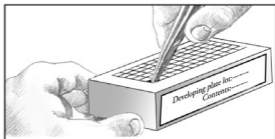
Recomenda-se a utilização de amostras frescas.

- Armazenar sangue inteiro a 2-8°C se o teste for realizado no prazo de 1 dia da coleta. Não congelar amostras de sangue total.
- Armazenar amostra de soro e plasma a 2-8°C se o teste for executado dentro de 3 dias da coleta. Se o teste for realizado após 3 dias da coleta, congelar as amostras a -20°C ou mais.
- Deixar as amostras à temperatura ambiente por 2 horas e homogeneizar bem antes do teste.

(2) Usar a micropipeta. Para amostra de sangue total pipetar 10 μL (pipetar 2 vezes 5 μL). Para testar o soro / plasma usar 5 μL .

(3) Misturar os reagentes homogeneizando delicadamente os reagentes, invertendo a placa reveladora várias vezes antes do uso.

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

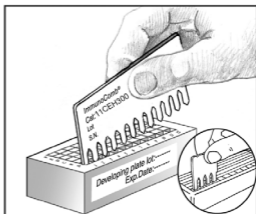


(5) Depositar amostra no poço da fileira A. Para o teste de soro / plasma use 5 μl . Para testar sangue total 10 μl *. Com a ponteira mergulhada na mistura subir e abaixar o êmbolo da pipeta várias vezes para homogeneizar a mistura. Evitar derramamento e contaminação cruzada de soluções.

* Somente para sangue total: pipetar a amostra, utilizando a mesma ponta para depositar duas vezes 5 μl no mesmo poço na linha A.

Não abrir qualquer cavidade da linha A ou de outras linhas que você não pretenda usar. Não retire a proteção de alumínio.

(6) Retirar o pente de seu envelope de proteção. Não tocar nos dentes do pente. Para testar menos do que 12 amostras, cortar ou romper o pente por dobragem nos entalhes, para a quantidade de testes necessários ou cortar com uma tesoura.



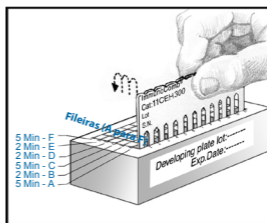
NOTA: MISTURAR DURANTE A INCUBAÇÃO É CRÍTICO PARA RESULTADOS VÁLIDOS.

****** Para melhorar a mistura, mova o pente para cima e para baixo 3-4 vezes. Durante a incubação, repetir o mesmo processo de mistura 2-3 vezes.

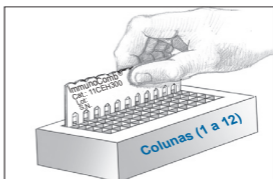
Evite encostar o lado da frente do pente, inclinándolo para a parte de trás durante a mistura.

Retirar o excesso de líquido dos dentes do pente, encostando a ponta do dente em papel absorvente, antes de movê-lo para o próximo poço.

- Inserir o Pente no poço aberto (s) na linha A (o lado impresso de frente para o operador) e incubar por 5 minutos.
- Movimentar o pente conforme descrito acima.**



- Antes de transferir o pente de um poço para outro, perfurar o alumínio do poço seguinte usando a pinça (linha B). Retirar suavemente o excesso de líquido dos dentes do pente encostando a ponta do dente em papel absorvente, e encaixar o pente, durante 2 minutos na linha B.
- Movimentar o pente como descrito acima.**
- Retirar o excesso. Inserir pente no poço seguinte (linha C) durante 5 minutos.
- Movimentar o pente como descrito acima.**
- Retirar o excesso. Mergulhar nas cavidades restantes (linhas D & E), durante 2 minutos cada e retirar o excesso, após cada etapa.
- Movimentar o pente como descrito acima.**
- No último poço (linha F) mergulhar o pente durante 5 minutos.
- Movimentar o pente como descrito acima**
- Após a fileira F, mova o pente de volta para a linha E por 2 minutos para fixação da cor.
- Retirar o pente, eliminar o excesso da solução da ponta do dente e deixar secar naturalmente por 5 minutos. **NÃO SECAR COM PAPEL.**



A sequência da técnica pode ser vista no site:
www.vpdiagnostico.com.br

VII. LEITURA DO TÍTULO DE IgG E INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO

■ O ponto superior, Referência Positiva, deve apresentar cor cinzenta. O tom da cor é o mesmo gerado por resposta positiva significativa de IgG. Este ponto deve ser lido como S3 em uma escala de S0 a S6. S3 é considerado “cutoff” do nível do anticorpo IgG, que é equivalente a uma resposta imune positiva com título de 1:80 pelo teste de Imunofluorescência indireta (IFA).

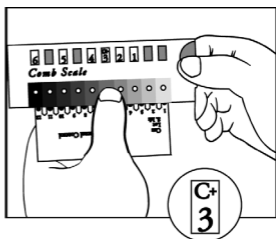
■ O ponto inferior no dente, de acordo com a intensidade da cor, informará o título de IgG contra E. Canis presente no soro do cão examinado.

■ Comparar o tom da cor deste ponto inferior com o ponto da Referência Positiva. Um ponto cinzento, bem visível indica uma resposta positiva. Um tom mais escuro do que a Referência Positiva, significa título elevado. Cor mais fraca do que a Referência Positiva indica uma resposta baixa, que equivale ao título de IFA de 1:20 a 1:40.

■ O título é avaliado utilizando a escala de tons cinza (Comb Scale) fornecida com o kit.

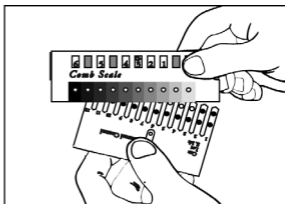
VIII. LEITURA DOS RESULTADOS COM O COMBSCALE

Alinhar o pente, com os tons de cinza nos retângulo da escala. Parear o ponto referência positivo (ponto superior), com o tom de cinza da escala mais parecido.



Marcar o retângulo escolhido e agora deslizar a régua amarela, até o C+ aparecer na janela que corresponde ao retângulo com o tom de cinza escolhido acima. Fixar a régua dentro desta posição durante a leitura. Esta etapa calibra realmente o C+ a S3.

Alinhar a escala de tons cinza (Comb Scale) com o resultado do teste (ponto inferior). Encontrar o tom de cinza na escala que mais se aproxime ao tom de cinza do (ponto inferior). O número que aparecer na janela acima, (S1 a S6) é o valor "S" de intensidade.



Importante: A margem do erro é similar a outros procedimentos de ELISA. Conseqüentemente, um erro de uma janela (S) na escala de cor não resultará em um diagnóstico errado.

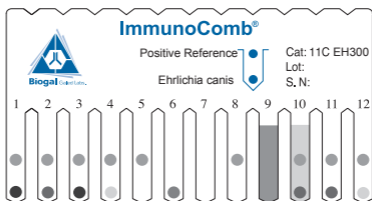
Tabela de conversão de títulos:

Títulos de *I.F	0	1:20 - 1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
CombScale	0	S1-2	S3	S4	S5	≥S6

Títulos de Imunofluorescência *

OBS.: o resultado pode ser avaliado por meio do programa CombScan e escaner com compatibilidade TWAIN (cd é fornecido gratuitamente se solicitado) ou leitora CombCan.

IX. EXEMPLO DE UM TESTE



Tooth N°	Results		Remarks
1, 3	≥S5	Reação forte positiva	Título 1:320-1280
2, 11	S3-S4	Reação média positiva	Título 1:80-1:160
4, 12	S1-2	Reação fraca positiva	Título 1:20-1:40
5, 8	S0	Reação negativa	Negativo
6, 7		*Referência Positiva sem reação	Teste inválido
9	*	*Sombreamento interfere com a leitura	Teste inválido
10	≥S3	Sombreamento não interfere com a leitura S ≥ 3 reação positiva	Positivo

* Repetir Teste

Para auxílio adicional contatar:

Distribuidor local pelo telefone: (41)3779-2130, 988178372, 3434-2721

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.com website: www.biogal.com

X. TABELA DE RECOMENDAÇÕES PARA *Ehlichia canis*

PACIENTE SAUDÁVEL			
Score S		Sem histórico de <i>E. canis</i>	Com histórico de <i>E. canis</i>
S0	Negativo	Checar no próximo ano	Checar no próximo ano
S1-2	Fraco Positivo (Suspeito)	Testar novamente em 7-10 dias	Compare o último resultado para checar o declínio dos títulos de anticorpos. Considerar avaliação do hemograma.
≥S3	Positivo	Estágio subclínico. Considerar avaliação do hemograma. Iniciar o tratamento se a contagem de plaquetas estiver $<200,000/\text{mm}^3$	A avaliação do hemograma é recomendada. Repetir o tratamento se a contagem de plaquetas estiver $<200,000/\text{mm}^3$

Nota:

Os títulos elevados de anticorpos podem persistir por 6-12 meses, ou mais. A contagem de plaquetas é útil para avaliar o estado clínico atual, a resposta ao tratamento e re-exposição ao agente.

PACIENTE DOENTE			
Score S	Resultado	Sem histórico de <i>E. canis</i>	Com histórico de <i>E. canis</i>
S0	Negativo	Considerar outro diagnóstico	Considerar outro diagnóstico
S1-2	Fraco Positivo (Suspeito)	Avaliar hemograma; testar novamente em 7-10 dias	Avaliar hemograma; testar novamente em 7-10 dias
≥S3	Positivo	Diagnóstico confirmado, estágio agudo, iniciar o tratamento, avaliar hemograma.	Um resultado positivo do *I.C. pode estar associado com o estado clínico atual.

Nota:

Altos títulos de anticorpos podem ocorrer em ambas as fases aguda e crônica. Avaliação do hemograma é recomendada.

XI. CONDIÇÕES DE CONSERVAÇÃO & MANIPULAÇÃO

- Armazenar o kit entre 2°C e 8°C.
- Não utilizar pente e placa de lotes diferentes.
- Não congelar o produto (temperatura abaixo de 0°C).
- Não tocar com os dedos a ponta dos dentes dos pentes onde está adsorvido o antígeno.
- Não expor a vácuo.

XII. APRESENTAÇÃO

Componentes	Kit para 12 testes (50CEH201)	Kit com 120 testes (50CEH210)
A. Cartão Plástico ImmunoComb	1	10
B. Placa reveladora	1	10
C. Pinça de plástico	1	1
D. Escala de cores CombScale	1	1
E. Micropipeta para 5 µL	1	Não incluída*
F. Ponteiros capacidade 10 µL	15	Não incluída*
Instruções de uso	1	1

***Para kit de 12 e 120 testes, usar micropipeta calibrada: 5µL se amostra de soro ou plasma e 10µL se sangue total.**



XIII. REFERÊNCIAS

Harrus S et al. (2002). Vet Microbiol. 86 (4), 361-368. Waner T et al. (2000). JI of Vet Diag Invest. 12, 240-244.
Waner T (1999). Diag of Canine Monocytic Eh Thesis, Utrecht U.
Waner T et al. (1997). Vet Para. 69, 307-317.

Biogal's
ImmunoComb