

ImmunoComb

CANINE PARVOVIRUS & DISTEMPER IgM

Kit de teste para determinação de anticorpos IgM de Parvovirose e Cinomose Canina

Instruções de Uso

USO VETERINÁRIO - PRODUTO IMPORTADO

Nº Cat. do Produto: 50CPD201/50CPD210



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
Registro no Ministério da Agricultura nº 10.014/2015
Fone: (41)3434-2721 / (41)98817-8372
Responsável Técnica: Dra. Margareth C. S. Agottani
CRMV-PR nº 3288
info@vpdiagnostico.com.br
www.vpdiagnostico.com.br

I.FINALIDADE DO KIT

O Kit Canine Parvo e Cinomose IgM determina o nível de anticorpos IgM no soro, plasma ou sangue total de cães contra o Parvovírus canino (CPV) e o Vírus da Cinomose Canina (CDV), tanto na infecção quanto na vacinação.

II.INFORMAÇÕES GERAIS

O **Parvovírus Canino (CPV)** e o **Vírus da Cinomose Canina (CDV)** são reconhecidos como importantes causas de doença e morte em cães. Os filhotes são mais suscetíveis à CPV e CDV, especialmente após o desmame quando o nível de Anticorpos Protetores Maternos (MDA - Maternal Derived Antibodies) diminui. Às vezes o MDA pode realmente interferir com vacinas que são dadas para a imunização. Em muitos países, os programas de vacinação reduziram significativamente, mas não eliminaram a incidência dessas doenças. Assim, CPV e CDV continuarão a ser motivo de grande preocupação clínica entre médicos veterinários em todo o mundo e ainda representam um desafio diagnóstico.

III.O QUE É O TESTE IMMUNOCOMB?

O teste é um kit de ELISA portátil. É um teste sensível que detecta níveis de anticorpos IgM no soro, plasma ou sangue total. Os resultados para CPV e CDV são obtidos em torno de 23 minutos.

IV.COMO FUNCIONA O CARTÃO IMMUNOCOMB?

■ O kit é baseado no princípio do imunoensaio em fase sólida, chamado DOT-ELISA.

■ Contém dois componentes principais: 1 cartão plástico ImmunoComb e 1 placa reveladora contendo reagentes para o teste.

■ O cartão de plástico tem formato de um pente com 12 dentes. Cada dente testa 1 soro.

■ Em cada dente do cartão estão adsorvidos **dois** antígenos e **um** controle positivo.

■ A placa reveladora contém 12 colunas de poços (1 a 12). Cada coluna é constituída de 6 poços (A,B,C,D,E,F) com reagentes diferentes. Cada coluna testa uma amostra, iniciando no poço da linha A.

■ Testando uma amostra: Após perfurar o alumínio do 1º poço da fileira “A”, a amostra a ser testada será introduzida com o auxílio de uma pipeta.

■ Destaca-se um dente do cartão e insere-se no poço. Anticorpos IgM contra os vírus da cinomose e parvovirose, se presentes no soro do cão, ligam-se aos antígenos adsorvido. Os anticorpos que não se ligarem serão lavados na segunda fileira “B” da placa.

■ A fileira “C” contém anticorpos anti-IgM canino ligados a uma enzima (conjugado). Ao inserir o dente do cartão plástico neste conjugado, os anticorpos que se ligaram nos antígenos no dente na fileira “A” serão marcados.

■ Após lavagens nas fileiras “D” e “E”, o dente é inserido na fileira “F”, onde ocorre a reação enzimática. Isso provocará produção de cor cinza nos pontos do dente do cartão plástico, revelando o nível de anticorpos presentes.

■ A intensidade do tom roxo-cinza determinará a quantidade de anticorpos presentes no soro.

■ Por meio da escala de tons cinza (*CombScale*), compara-se a intensidade da cor entre o ponto **Referência Positiva** (ponto superior) e os pontos inferiores (parvovirose e cinomose)

■ Obs: Os dentes do cartão plástico ImmunoComb são destacáveis, podendo ser utilizados individualmente.

V.DESCRICÃO DAS DOENÇAS

A propagação da infecção por **Parvovirose Canina (CPV)** pode ocorrer por meio da exposição ao ambiente contaminado. Os sinais clínicos da CPV incluem letargia, depressão, inapetência, febre, vômitos e diarreia (às vezes com sangue). A mortalidade é alta em filhotes.

O **Vírus da Cinomose Canina (CDV)** é naturalmente transmitido de cão para cão pelas vias aéreas. A infecção natural da CDV pode causar febre transitória que pode passar despercebida. Em alguns casos, a doença é caracterizada por febre intermitente, depressão, secreção óculo-nasal e anorexia. Sinais respiratórios e gastrintestinais podem existir. Em cães que sobrevivem à fase aguda da doença, muitos (mas não todos) vão desenvolver sinais no sistema nervoso central (SNC), incluindo neurite óptica e lesões de retina. Os sinais mais conhecidos do SNC são ataxia, paresia e convulsões.

VI.DIAGNÓSTICO

Os exames laboratoriais podem ser úteis para confirmar o diagnóstico. Além de hematologia e bioquímica do sangue, a sorologia está se tornando uma ferramenta mais amplamente aceita de diagnóstico.

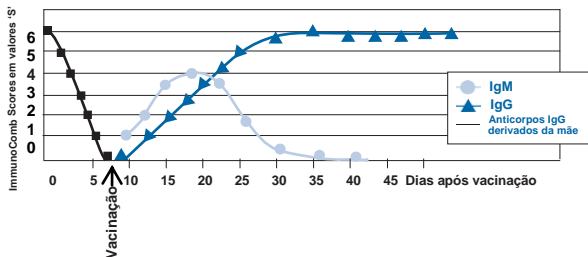
A sorologia fornece uma ideia mais ampla do estado imunológico do cão. A resposta imunitária humoral é largamente composta de duas classes de imunoglobulinas (anticorpos), IgM e IgG. Nos primeiros sete dias, após a infecção ou vacinação, os anticorpos

IgM são produzidos em grandes quantidades.

Posteriormente, os títulos de IgM declinam, enquanto os níveis de IgG aumentam. Portanto, em cães que são capazes de desenvolverem resposta imune, os níveis elevados de IgM indicam infecção recente.

A ausência de anticorpos IgM com um elevado título de IgG sugere que a exposição ao vírus ocorreu mais cedo. Elevados níveis de IgG são tipicamente encontrados em cães que sobrevivem à fase aguda da infecção, ou a seguir à vacinação (Fig. 1).

Fig. 1 – Níveis de Anticorpos Pós-Vacinação da CPV e CDV em cães saudios



VII. EXPLICAÇÃO PASSO A PASSO DO TESTE

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

VIII. TÉCNICA

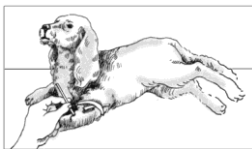
OBS.: Pipeta e ponteiros não são incluídas nos kits com 120 testes.

Antes de realizar o teste, mantenha todos os componentes do kit e as amostras a temperatura ambiente (20° a 25°C), por 60 a 120 minutos ou incube apenas a placa durante 22 minutos a 37°C, Homogeneíze delicadamente os reagentes invertendo a placa reveladora várias vezes antes do uso.

(1) Obtenha uma amostra de sangue do cão.

Pode ser sangue sem anticoagulante para obtenção de soro. Caso for testar com sangue total, colete amostra com EDTA ou heparina.

Recomenda-se a utilização de amostras frescas.



■ Armazene o sangue total a 2-8°C se o teste for realizado no prazo de 1 dia da coleta. Não congelar amostras de sangue total.

■ Armazene a 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, congele as amostras a -20°C ou mais.

■ Deixe as amostras à temperatura ambiente por 2 horas e homogeneíze bem antes do teste.

■ Use a micropipeta. Para amostra de sangue total pipete 10 μ L (pipete 2 vezes 5 μ L). Para testar o soro/plasma, use 5 μ L.

(2) Misture os reagentes da placa invertendo suavemente a placa várias vezes antes de usar.



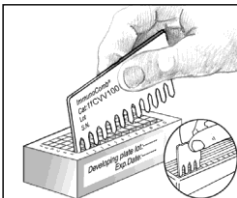
(3) Utilize a pinça para perfurar a tampa de alumínio de proteção da linha A. Um poço para cada amostra.

(4) Deposite a amostra no poço da fileira A.

Para o teste de soro/plasma use 5 μ L. Para testar sangue total, use 10 μ L*. Com a ponteira mergulhada na mistura levante e abaixe o êmbolo da pipeta várias vezes para homogeneizar a mistura. Evite o derramamento e a contaminação cruzada entre soluções.

***Somente se for utilizar sangue total: pipete a amostra com a pipeta fornecida no kit. Use a mesma ponta para depositar duas vezes o volume de 5 μ L (total de 10 μ L) no mesmo poço na linha A. Não abra qualquer cavidade da linha A ou de outras linhas que você não pretenda usar. Não retire a proteção de alumínio.**

Retire o pente de seu envelope de proteção. Não toque nos dentes do pente. Para testar menos do que 12 amostras, corte ou rompa o pente por dobragem nos entalhes, para a quantidade de testes necessários ou corte com uma tesoura.



NOTA: DURANTE A INCUBAÇÃO, A MISTURA É ESSENCIAL PARA RESULTADOS VÁLIDOS.

**** Para a mistura, mova o pente para cima e para baixo 3 a 4 vezes durante a incubação. Repita o mesmo processo de mistura 2 a 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.

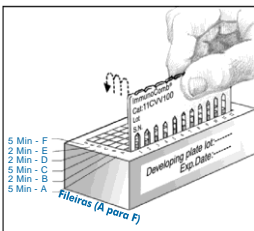
■ Insira o pente no(s) poço(s) aberto(s) da linha 'A' (o lado impresso de frente para o operador) e incube por 5 minutos.

■ Movimente o pente conforme descrito acima.**

Antes de transferir o pente de um poço para outro, perfure o alumínio do poço seguinte (linha B) utilizando a pinça.

■ Retire suavemente o excesso de líquido dos dentes do pente encostando a ponta do dente em papel absorvente.

■ Encaixe o pente nos poços da linha B durante 2 minutos.



■ Movimente o pente como descrito acima.**

■ Retire o excesso. Insira o pente no poço seguinte (linha C) durante 5 minutos.

■ Movimente o pente como descrito acima.**

■ Retire o excesso. Mergulhe nas cavidades restantes (linhas D & E) durante 2 minutos cada e retire o excesso após cada etapa.

■ Movimente o pente como descrito acima.**.

■ No último poço (linha F) mergulhe o pente durante 5 minutos.

■ Movimente 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.

■ Retire o pente, elimine o excesso da solução da ponta do dente e deixe secar naturalmente por 5 minutos. NÃO SEQUE COM PAPEL.



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

IX. LEITURA DO TÍTULO DE IgM E INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO

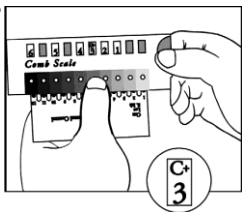
■ O ponto superior no dente é a referência positiva. O tom da cor desse ponto é o mesmo gerado por uma resposta positiva significativa de anticorpos contra o vírus da Parvovirose e da Cinomose. Este ponto deve ser lido como S3 na *CombScale*, numa escala de S0 a S6.

■ O ponto mediano no dente do pente fornece o resultado de anticorpos IgM contra o CPV na amostra. O ponto inferior do dente do pente fornece o resultado de anticorpos IgM contra o CDV na amostra.

- Compare o tom da cor dos pontos do CPV e dos pontos de teste do CDV com o ponto de **referência positiva** (separadamente).
- Para avaliar a pontuação de anticorpos, utilize a *CombScale* fornecido no kit.
- É considerado positivo um resultado com a cor igual ou mais forte do que S2.
- Se não houver coloração, é considerado resultado negativo.
- Cor tênue igual ou menor que S1 é considerada inconclusiva.

LEITURA DOS RESULTADOS 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, alinhe-o com a *CombScale* fornecida no kit. Encontre o tom de roxo-cinza na *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.

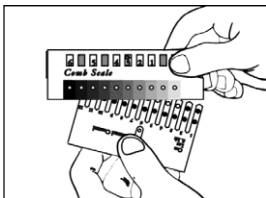
Segure a régua nesta posição durante toda a leitura. Este passo calibra o controle positivo ao score S3, que é o ponto de "cut-off" o qual os pontos de teste serão comparados.

Enquanto mantém a

régua fixa,

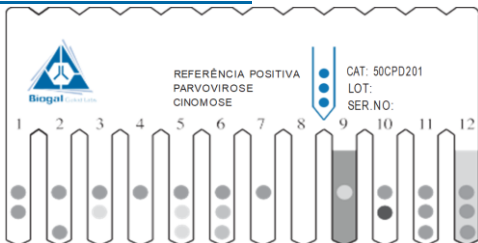
encontre o tom de roxo-cinza na *CombScale* que mais se aproxima do ponto do resultado do teste desejado (um dos pontos mais baixos). O número que aparece na janela

acima é a pontuação *CombScale* (S0-S6). Repita este passo com cada ponto de teste separadamente.



OBS.: o resultado pode ser avaliado também por meio da leitora COMBCAM. (entre em contato pelo e-mail info@vpdiagnostico.com.br)

X. EXEMPLO DE UM TESTE



Dente N°	Resultados para CPV		Resultados para CDV	
1	≥S3	Positivo	S0	Negativo
2	S0	Negativo	≥S3	Positivo
3	≥S1	Inconclusivo	S0	Negativo
4	S0	Negativo	S0	Negativo
5	≥S1	Inconclusivo	≥S1	Inconclusivo
6	S2	Positivo	S2	Positivo
7	S0	Negativo	S0	Negativo
8*		Inválido		Inválido
9**		Inválido		Inválido
10	≥S5	Positivo	S0	Negativo
11	≥S3	Positivo	≥S3	Positivo
12***	≥S3	Positivo	≥S3	Positivo

Observações:

* Nenhuma Referência Positiva. Repetir o teste.

** Cor de fundo muito escura. Repetir o teste.

*** Cor de fundo escura com resultado positivo.

Para mais informações sobre o significado dos *scores* em títulos de anticorpos, consulte o documento “Tabelas de Conversão de Títulos para o Kit Parvovirose e Cinomose IgM” enviado junto ao kit.

Para auxílio adicional, entre em contato:

VP Diagnóstico Distribuidora
(41)3434-2721, (41) 98817-8372

info@vpdiagnostico.com.br

www.vpdiagnostico.com.br

Fabricante

Laboratórios da Biogal Galed

Fone: 972-4-9898605, Fax: 972-4-9898690

info@biogal.com

www.biogal.com

XI. CONSERVAÇÃO E MANIPULAÇÃO

- Armazene o kit entre 2°C e 8°C.
- Não utilize pente ou placa de lotes diferentes.
- Não congele o produto (temperatura abaixo de 0°C).
- Não toque na ponta dos dentes do pente onde está adsorvido o antígeno.
- Não exponha a vácuo.

XII. RISCOS DURANTE A MANIPULAÇÃO

- O kit contém azida sódica, NaN₃ 0,1%, considerado **carcinogênico** e material biológico inativado.
- Ao proceder ao teste é recomendado utilizar luvas descartáveis e óculos.
- Caso as soluções dos poços caiam acidentalmente nas mãos ou olhos e bancada, lave com bastante água corrente.
- Elimine as soluções dos poços primeiramente em frasco com hipoclorito. Ao eliminar no sistema de esgoto deixe escorrer bastante água pelo sistema.
- Mantenha longe de crianças e animais domésticos.

XIII. APRESENTAÇÃO

Componentes	Kit com 12 testes (50CPD201)	Kit com 120 testes (50CPD210)
A. Cartão Plástico ImmunoComb	1	10
B. Placa reveladora	1	10
C. Pinça de plástico	1	1
D. Escala de cores <i>CombScale</i>	1	1
E. Micropipeta para 5 µL	1	Não incluída*
F. Ponteiras (capacidade 10 µL)	15	Não incluída*
Instruções de uso	1	1

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



XIV. REFERÊNCIAS

- Harrus et al. (2002). *Jl of Small Animal Prac.*, 43,27-31.
Waner T. (2002). 27th WSAVA Congress, Oct., Spain.
Waner et al. (2003). *Vet. Record*, 152,588-591

Biogal's
ImmunoComb