

# BRUCELLA FPA

## Kit de teste para anticorpos contra *Brucella abortus*

### USO VETERINÁRIO

O **BRUCELLA S ANTIBODY TEST KIT** é um teste qualitativo, baseado no método da Polarização Fluorescente (FPA), que determina a presença de anticorpos contra *Brucella abortus* em soro bovino. A presença de anticorpos é indicativa de infecção prévia por *Brucella abortus* ou vacinação com a vacina cepa B19. Bovinos vacinados com vacina RB 51 não são reagentes positivos no teste.

Este teste diagnóstico utiliza O-polissacarídeo (OPS), extraído da *Brucella abortus* e conjugado com fluoresceína. Para aferir a intensidade da polarização, emitida pelo conjugado OPS, utiliza-se equipamento especialmente desenhado para a leitura da polarização fluorescente.

Quando não há anticorpos presentes, a polarização é baixa. Já quando, os anticorpos se ligam ao conjugado a polarização aumenta.

## Componentes do Kit

Reagentes	250 testes	1000 testes
<b>Controle Positivo</b>	1 mL	1 mL
Pronto para uso; soro positivo contendo anticorpos contra <i>Brucella abortus</i> .		
<b>Controle Negativo</b>	2 mL	2 mL
Pronto para uso; soro negativo sem a presença de anticorpos contra <i>Brucella spp.</i>		
<b>Diluyente da Amostra 25X</b>	50 mL	50 mL
Tampão diluyente para diluição em água destilada ou deionizada.		
<b>Conjugado (Tracer)</b>	2,5 mL	10 mL
Pronto para uso; contém o polissacarídeo OPS, extraído da <i>Brucella abortus</i> e conjugado com fluoresceína.		

**Nota: Todos os componentes contém azida sódica 0,095% como conservante.**

Material exigido, mas não fornecido:

- Equipamento Leitor FPA de tubo único;
- Tubos de ensaio de borosilicato 10 x 75 mm;
- Placas de microtitulação de fundo plano preto de 96 poços para instrumento FPA Sentry 2000;
- Micropipeta de volume ajustável;
- Ponteiras para micropipeta;
- Vórtex para tubo (opcional);
- Agitador de placa de microtitulação;
- Água destilada ou deionizada para a reconstituição do tampão.

## Material necessário, mas não fornecido:

### Estabilidade e Armazenamento

Os reagentes FPA devem ser armazenados em geladeira (2 - 8°C) e mantidos à temperatura ambiente (18 - 25°C) antes do uso. A temperatura deve ser monitorada. O tampão, depois de diluído, deve ser armazenado em temperatura ambiente e terá validade de até 30 dias a partir da data de diluição. Não use o kit de teste após a data de vencimento impressa na caixa. Durante o uso, evite expor o **controle negativo** a temperaturas superiores a 25 °C.

### Recomendações

A tecnologia FPA funciona em líquidos homogêneos claros e turvos. Evite práticas que possam contaminar os controles do teste, tampão ou conjugado.

A leitura pode ser afetada pela temperatura. Os resultados podem diminuir em 3 mP (unidades de milipolarização) em função da elevação da temperatura em 4°C dos componentes do teste, incluindo a amostra.

A amostra e os controles devem estar à mesma temperatura.

Deixar amostra e controles à temperatura ambiente antes do teste.

Evite variações de temperatura superiores à 1°C durante a realização do teste.

O **Controle Negativo** deve ser executado em **triplicata**. Faça novas leituras após cada 60 amostras. Use a **média** do **controle negativo** para a avaliação do *status* das amostras subsequentes.

Todos os componentes deste kit devem ser tratados como produtos químicos de laboratório.

Evite a ingestão, o contato com os olhos e outras possíveis exposições prejudiciais. Não use kits com vencimento expirado, componentes contaminados ou componentes de outros kits. Não misture componentes de diferentes lotes fabricados.

### Etapas Preliminares

#### Reagentes e Preparação de Amostra

1. Deixe os reagentes à temperatura ambiente (18 - 25°C) antes da utilização. Monitore a temperatura;

2. Dilua o diluente de amostra, misturando **uma parte** do **Diluente de 25X** com **24 partes** de água destilada ou deionizada. O diluente preparado deve estar livre de partículas e deve ser armazenado à temperatura ambiente, podendo ser utilizado por até **30 dias**;
3. As amostras devem estar livres de partículas. Centrifugue todas as amostras contendo quaisquer partículas visíveis. As amostras hemolisadas são aceitáveis para testes. Amostras com hemólise escura ou alto conteúdo bacteriano, não devem ser utilizadas.
4. Amostras liofilizadas devem ser reconstituídas completamente e amostras congeladas devem ser completamente descongeladas e homogeneizadas.

## **Ajuste do Equipamento**

Os equipamentos devem ser configurados e calibrados de acordo com as especificações do fabricante ou distribuidor. Para informações detalhadas, consulte o manual do equipamento ou entre em contato com o suporte técnico pelo e-mail [info@vpdiagnostico.com.br](mailto:info@vpdiagnostico.com.br).

## **Protocolo para Equipamento de Tubo Único (série SENTRY)**

1. **Posicione** os tubos de ensaio de borosilicato de 10x75 mm no suporte. Use um tubo por amostra, um tubo para controle positivo e **3 tubos** para **controle negativo**. Evite usar tubos riscados, com defeito perto da área de medição ou tenham detritos ou fragmentos de vidro no interior. O tubo deve ser utilizado apenas uma vez;
2. **Identifique** os tubos de ensaio na parte superior correspondentes à amostra, ao controle positivo e cada um dos tubos controle negativo;
3. **Adicione 1 mL** do diluente diluído em todos os tubos;
4. **Adicione 10 µL** da amostra no tubo identificado AMOSTRA;
5. **Adicione 10 µL** do controle negativo em 3 tubos identificados CONTROLE NEGATIVO;
6. **Adicione 10 µL** do controle positivo no tubo identificado CONTROLE POSITIVO;
7. **Homogeneíze com cuidado. Preferencialmente em agitador.**
8. **Incube** os tubos de ensaio à temperatura ambiente entre 5 e 60 minutos;
9. **Coloque** cada tubo no leitor FPA e obtenha a leitura inicial (leitura em branco);
10. **Adicione 10 µL** de *Tracer* (conjugado) em todos os tubos e homogeneíze com cuidado. Preferencialmente em agitador.
11. **Incube** os tubos à temperatura ambiente durante pelo menos 3 a 5 minutos;
12. **Realize** a leitura;
13. **Calcule** a média mP dos resultados da leitura dos 3 tubos do controle negativo.

## **Procedimento para Equipamento de Placa de Microtitulação**

1. Adicione **20 µL** dos controles e amostras nos poços da placa de microtitulação preta de 96 poços. **Três controles negativos e um controle positivo**. Tenha cuidado para evitar bolhas durante o procedimento;
2. Adicione **180 µL** do diluente diluído em todos os poços contendo controles e amostras. Misture com cuidado. Tenha cuidado para não derramar amostras de um poço a outro;
3. Incube a placa por 3 a 5 minutos à temperatura ambiente;
4. Coloque a placa de microtitulação no leitor de FPA e obtenha a leitura inicial de diluente e amostra, denominada leitura em branco;
5. Adicione, imediatamente, **10 µL** do conjugado em todos os poços contendo controles e amostras. Misture com cuidado;
6. Incube a placa durante 2 minutos à temperatura ambiente;
7. Anote a leitura da amostra.

## **Validação do Teste**

1. Os resultados da leitura do **controle positivo** devem estar compreendidos entre 120 e 250 mP;
2. A média da leitura dos **controles negativos** deve ter valor compreendido entre 70 e 95 mP;

Nota: Se a leitura do Controle Negativo ou do Controle Positivo resultar em valor não compreendido nas faixas mínima ou máxima acima, o equipamento deverá ser recalibrado de acordo com os procedimentos descritos no manual do equipamento.

## Resultados e Interpretação

### Cálculo do valor $\Delta mP$

Subtraia o valor em mP da amostra do valor da média do controle negativo:

**$\Delta mP$  = valor em mP da amostra - média do valor em mP dos controles negativos**

### Interpretação

Para interpretação dos resultados de  **$\Delta mP$**  utilize a tabela abaixo:

<b><math>\Delta mP</math> menos de 10 mP</b>	<b><math>\Delta mP</math> de 10 a 20 mP</b>	<b><math>\Delta mP</math> mais de 20 mP</b>
<b>Negativo</b>	<b>Suspeito</b>	<b>Positivo</b>

## RETESTE

As amostras com resultados **positivos** e **suspeitos** devem ser retestadas EM DUPLICATA, utilizando agora **20  $\mu$ L** da amostra em cada tubo.

1. Se os resultados em  **$\Delta mP$**  dos 2 tubos forem inferiores a 10 mP a amostra é considerada NEGATIVA.
2. Se o resultado em  **$\Delta mP$**  de um dos tubos permanecer de 10 a 20 mP a amostra é considerada SUSPEITA.
3. Se o resultado em  **$\Delta mP$**  de ambos os tubos forem superiores a 20 **mP**, o resultado é considerado POSITIVO.

## Referências

---

- United States Patent No. 5, 976, 820; 1999. (Jolley, M. & Nielsen, K.).  
USDA APHIS Doc# 91-45-013, Uniform Methods & Rules, 2003.  
USDA APHIS Brucellosis FP Evaluation Report. Website Report, 2004.  
EFSA, Opinion on Brucellosis Diagnostic Methods, The EFSA Journal 2006 (432).  
OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2004.  
Nielsen, K. et al, OIE Scientific and Technical Review. 2004. 23: 979-987.  
Gall, D. et al, OIE Scientific and Technical Review. 2004. 23: 989-1002.  
Jolley, M. et al, Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. 2003.  
McGiven, J. et al, Journal of Immunological Methods. 2003. (278): 171-178.  
Nielsen, K. et al, J. Immunoassay & Immunochemistry. 2001. 22(3): 183-201.  
Nielsen, K. et al, Vet. Immunol. & Immunopathology. 1998. 66(3-4): 321-329.  
Nielsen, K. et al, Journal of Immunological Methods. 1996. 195(1-2):161-168.  
EU Council Directive 64/432/EEC, 2008.

## Garantia

---

O fabricante **Ellie LLC** garante ao comprador que substituirá, total ou parcialmente, produtos defeituosos sob uso normal descritos nesta embalagem, exceto em casos listados em "**Exclusões**". A obrigação de Ellie LLC sob esta garantia está limitada a substituição, por opção da empresa, dos produtos aplicáveis. Esta garantia só se aplica a defeitos que são relatados e após a análise da empresa Ellie LLC. A garantia se estende apenas ao comprador do produto, e não é transferível ou atribuível e aplicável a apenas a produtos dentro da validade.

Entre em contato com o Serviço Técnico da Ellie LLC para consultas ou problemas de serviço de garantia através de seu Distribuidor no Brasil VP Diagnóstico pelo e-mail info@vpdiagnostico.com.br.

## Exclusões

---

Não há cobertura de garantia e o fabricante não será responsável nas seguintes circunstâncias:

- Qualquer produto que tenha sido alterado, modificado ou adulterado por qualquer pessoa ou entidade que não seja o fabricante Ellie LLC;
- Defeitos, danos ou outras condições causadas, total ou parcialmente, por uso indevido, abuso, negligência, alteração, acidente, adulteração ou substituição em tempo hábil;
- Produtos que não foram usados, ou devidamente armazenados e mantidos conforme exigido neste manual, rótulos, invólucros, etc.
- Representações e garantias feitas por qualquer pessoa ou entidade que não seja o fabricante Ellie LLC.

## **Limitação de Responsabilidade**

Em nenhuma circunstância, o fabricante Ellie LLC ou qualquer de suas afiliadas será responsável por você ou qualquer outra pessoa por perda de lucro ou uso, especial, incidental, consequente, indireto, exemplar, punitivo ou múltiplos danos, incluindo sem limitação para perda ou interrupção de negócios, decorrentes da fabricação, venda, fornecimento ou uso de nossos produtos ou serviços ou falha ou atraso na entrega de tais produtos ou serviços, seja com base em garantia, contrato, delito ou de outra forma, mesmo que tenhamos sido avisados da possibilidade de tais danos ou perdas. Toda a nossa responsabilidade por um produto ou serviço, seja com base na garantia, contrato, delito ou de outra forma, não deve exceder o valor que você pagou por tal produto ou serviço.

## **Fabricante**

Ellie LLC  
N114 W19320 Clinton Dr., Unit 5  
Germantown, WI 53022, United States of America  
Phone: +1 (800) 556-6953 / support@ellielab.com

## **Representante, Importador e Distribuidor**

**Representante Exclusivo no Brasil, Importador e Distribuidor:** JMR Trading LTDA.

Rua Mandaguari, 1752, Pinhais – Paraná.

**CNPJ:** 11.857.347/0001-71

**Fone:** (41) 3434-2721 / [info@vpdiagnostico.com.br](mailto:info@vpdiagnostico.com.br) [www.vpdiagnostico.com.br](http://www.vpdiagnostico.com.br)

Licenciado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob nº 10.343/2020 em 25/06/2020.

**Responsável Técnica:** Margareth C. S. Agottani, CRMV-PR 3288

## **PRODUTO IMPORTADO**