

BRUCELLA FPA / BRUCELA'S ANTIBODY TEST KIT

BRASIL
 Kit de teste para anticorpos contra
Brucella abortus
BRUCELLA FPA
 Código do Produto B1001BRA
 Modelo de Bula 14/08/2023

Uso Veterinário

O BRUCELLA'S ANTIBODY TEST KIT é um teste quantitativo, baseado no método da Fluorescência Polarizada (FPA), que determina a presença de anticorpos contra espécies de *Brucella* formadoras de colônias lisas (*B. abortus* em soro bovino/bubalino bem como de suínos e caprinos).

Em bovinos, a presença de anticorpos é indicativa de infecção prévia por *Brucella abortus*. Os resultados do teste permitem identificar animais portadores de *Brucella abortus* ou com resposta vacinal em fêmeas vacinadas com a B19, após os 8 meses de idade. Fêmeas vacinadas com a vacina RB51 resultarão em negativas ao teste.

Este método utiliza o lipopolissacarídeo-O (OPS), extraído da *Brucella abortus*, e conjugado com fluoresceína. Para aferir a intensidade da polarização, emitida pelo conjugado OPS, utiliza-se o equipamento fabricado especialmente para a leitura da Fluorescência Polarizada.

Quando não houver presença de anticorpos, a polarização será baixa; já, quando houver anticorpos, estes se ligam ao conjugado e, assim, a polarização aumentará.

Componentes do kit

| | 250 Testes | 1000 Testes |
|--------------------------|---------------|----------------|
| Controle Positivo | 1 mL | 1 mL |
| Controle Negativo | 2 mL | 2 mL |
| Diluyente de Amostra 25X | 50 mL | 50 mL |
| Conjugado (Tracer) | 2,5 mL | 10 mL |

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

Material necessário, mas não fornecido

- Leitora FPA Sentry de tubo único;
- Tubos de ensaio de borossilicato 10 x 75 mm;
- Placas de microtitulação para FPA;
- Micropipeta de volume ajustável;
- Ponteiras para micropipeta;
- Vórtex para tubo (opcional);
- Agitador de placa de microtitulação;
- Água destilada ou deionizada estéreis.

Estabilidade e Armazenamento

Os reagentes FPA devem ser armazenados em geladeira (2-8°C). Quando forem utilizados, devem ser incubados à temperatura ambiente (18-25°C) antes do uso. A temperatura deve ser monitorada. (Instrução Normativa Nº 34, de 8 de setembro de 2017).

O tampão, após diluído, deve ser armazenado entre 2 e 8°C. Terá validade de 1 mês, a partir da data de diluição.

Recomendações

1. Não utilize a mesma ponteira para pipetar os controles do teste, tampão, conjugado ou amostra;
2. A leitura do teste pode ser alterada em função da diferença de temperatura, entre os componentes do kit e amostra. Sempre monitore;
3. É necessário que os componentes do kit e amostras, permaneçam pelo menos 60 minutos, em sala, com temperatura controlada, entre 18 e 25°C;

4. O Controle Negativo deve ser executado em triplicata. A média do controle negativo é utilizada para o cálculo do resultado;

5. Todos os componentes do kit, devem ser tratados como produtos químicos de laboratório. Evite a ingestão e contato com os olhos;

6. Não utilize kits com vencimento expirado e componentes de kits diferentes, ou de diferentes lotes.

Etapas Preliminares Reagentes e Preparação de amostra

1. Deixe os reagentes e amostras por 60 minutos à temperatura ambiente (18 – 25°C) antes da utilização. Monitore a temperatura;
2. Dilua o diluyente de amostra, misturando uma parte do **Diluyente 25X** com 24 partes de água destilada ou deionizada estéreis. O diluyente preparado deve estar livre de partículas;
3. As amostras de soro devem estar livres de partículas. Centrifugue todas as amostras. Centrifugue novamente, caso verifique qualquer partícula em suspensão. As amostras hemolisadas não devem ser utilizadas no teste.
4. As amostras liofilizadas devem ser reconstituídas completamente.

Calibração da Leitora

A leitora deverá ser calibrada a cada 1 ano em Laboratório de Calibração.

Ajustes da Leitora

A Leitora deverá sofrer ajustes, utilizando o kit para ajuste, fornecido com o Kit FPA *Brucella*., nas seguintes situações:

- a) antes de seu primeiro uso;
- b) a cada quatro a seis meses;
- c) se não foi utilizada por um longo período de tempo;
- d) quando houver evidências de problema com o desempenho;
- e) antes de utilizar um novo Kit FPA *Brucella*. (Vide Instruções para Ajustar ou **Guia Rápido I ajuste da leitora SENTRY**).

Para informações detalhadas, consulte o manual da leitora ou entre em contato com o suporte técnico pelo e-mail: info@vpdiagnostico.com.br

Procedimento de Ensaio

Protocolo para Leitora de Tubo Único (série Sentry):

(manter amostras e soluções entre 18 e 25°C por 60 minutos antes do teste. Monitore a temperatura)

1. Posicione os tubos de ensaio em uma estante de tubos. Use **1 tubo** por amostra, **1 tubo** para o controle positivo e **3 tubos** para o **controle negativo** (ver NOTA 2, mais a frente, sobre manuseio dos tubos). Por segurança, o tubo deve ser utilizado apenas uma vez;

2. Identifique na parte superior os tubos: a amostra, o controle positivo e os controles negativos;

3. Adicione 1 mL de diluyente diluído em todos os tubos;

4. Adicione 10 µL da amostra no tubo identificado **AMOSTRA**;

5. Adicione 10 µL do controle negativo nos 3 tubos identificados como **CONTROLE NEGATIVO**;

6. Adicione 10 µL do controle positivo no tubo identificado como **CONTROLE POSITIVO**;

7. Homogeneíze com cuidado. De preferência em agitador.

8. Incube os tubos de ensaio à temperatura ambiente (18–25°C) entre 5 e 60 minutos;

9. Coloque cada tubo no leitor FPA e obtenha a leitura inicial (leitura em branco); Ver passo 03 do **Guia Rápido IV**.

10. Adicione 10 µL do Tracer/ Conjugado nos tubos e homogeneíze em vórtex;

11. Incube os tubos à temperatura ambiente (18 – 25°C) por 5 a 60 minutos;

12. Faça a leitura do controle positivo e dos 3 tubos do controle negativo (**Consulte o Guia Rápido IV**). Calcule a média **mP** da leitura dos 3 tubos do controle negativo;

OBSERVAÇÃO

13.1 A leitura do controle positivo deve estar compreendida entre **120 e 250 mP**;

13.2 A média dos controles negativos deve estar compreendida entre **70 e 90 mP**;

NOTA 1

Se a leitura do Controle Positivo ou a Média dos Controle Negativos, estiverem fora das faixas mínima ou máxima, (vide item 13.1 e 13.2) o fator G, deverá ser alterado, vide **Guia Rápido II**.

Caso a leitura seguir resultando fora da faixa mínima e máxima, a leitora deverá ser calibrada;

14. Faça a leitura das amostras e anote os resultados em mP (unidades de milipolarização);

15. Obtenha o resultado de cada amostra, valor **Δ mP**, subtraindo a média dos controles negativos, do valor da leitura mP da amostra.

Procedimento para placa de Microtitulação

1. Adicione **20 μ L** dos controles e amostras nos poços da placa de microtitulação de 96 poços. Três controles negativos e um Controle Positivo. Evite formação de bolhas durante o procedimento;
2. Adicione **180 μ L** de diluente diluído em todos os poços com controles e amostras. Agite. Tenha cuidado para não misturar soluções entre os poços;
3. Incube a placa por 3 a 5 minutos à temperatura ambiente entre 18-25 °C
4. Coloque a placa de microtitulação no leitor de FPA e obtenha uma leitura inicial do diluente + amostra, denominada leitura em branco;
5. Adicione imediatamente **10 μ L** do conjugado em todos os poços contendo controles e amostras. Misture com cuidado;
6. Incube a placa durante 2 minutos à temperatura ambiente 18-25 °C;
7. Anote a leitura da amostra.

Resultados e Interpretação

Cálculo do valor Δ mP

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

Δ mP = valor em mP da amostra – média do valor em mP dos controles negativos

$$\Delta mP = (\text{Amostra mP} - \text{CN Médio mP})$$

Interpretação:

Utilize a Tabela abaixo:

| Δ mP ≤ 10 mP | Δ mP de 10,1 a 20 mP | Δ mP >20 mP |
|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| NEGATIVO | SUSPEITO | POSITIVO |

RETESTE

O reteste serve como confirmação de que os procedimentos, de uma amostra com resultado SUSPEITO, foram realizados corretamente conforme as informações a seguir:

As amostras com resultados SUSPEITOS, **devem ser retestadas EM DUPLICATA**, utilizando agora 20 μ L da amostra em cada tubo.

A Critério do Médico Veterinário, poderá seguir a Instrução Normativa SDA Nº10, ITEM IV - animais **inconclusivos**, poderão ser retestados entre trinta e sessenta dias, usando o teste Brucella FPA. (leia mais a frente item IV). Devendo o animal, permanecer isolado do rebanho.

INTERPRETAÇÃO DO RETESTE

NEGATIVO: Se os resultados em Δ mP dos 2 tubos for ≤ 10 mP;

INCONCLUSIVO: Se o resultado em Δ mP de um dos tubos permanecer de 10,1 a 20 mP;

POSITIVO: Se o resultado em Δ mP dos 2 tubos, forem superiores a 20 mP.

Seguir abaixo, segundo **INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA Nº 10, DE 3 DE MARÇO DE 2017. Art. 27.**

O Teste de Polarização Fluorescente (FPA) será utilizado como teste único ou como teste confirmatório em animais reagentes ao teste do AAT ou inconclusivos ao teste do 2-ME, de acordo com as seguintes condições e critérios:

I - a amostra ser colhida e encaminhada ao laboratório por médico veterinário habilitado ou oficial;

II - ser realizado por laboratório da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária;

III - a interpretação do teste obedecerá o disposto na Tabela do Tópico: Resultados e Interpretação;

IV - animais **inconclusivos** poderão ser, a critério do médico veterinário responsável pela coleta e do proprietário dos animais:
(**OBS: Devendo o animal, permanecer isolado do rebanho.**)

a) **retestados** entre trinta e sessenta dias, usando o teste FPA, sendo classificados como positivos se apresentarem, no reteste, resultado positivo ou resultado inconclusivo; ou

b) **submetidos**, em até trinta dias, ao teste de fixação de complemento; ou

c) **destinados** ao abate sanitário ou à eutanásia.

NOTA 2

Os ensaios em duplicata de amostras suspeitas, se faz necessário devido à contaminação de amostras com artefatos, riscos nos tubos de borossilicato, sujidades e fragmentos, que às vezes, passam despercebidos pelo técnico, podendo causar, resultados errôneos.

O reteste de amostras positivas, também pode ser realizado, mas não é obrigatório, basta seguir as recomendações a seguir:

Para obter-se resultado final seguro:

- Use tubos limpos e sem resíduos;
- Evite utilizar tubos de ensaio riscados, com defeitos próximos à área de medição ou com detritos ou fragmentos de vidro dentro;
- Segure os tubos de ensaio pela parte superior. Manchas podem causar erros na medição;
- Identifique na parte superior do tubo de ensaio, o número da amostra, para garantir que as diferentes leituras no mesmo tubo sejam corretas;
- Use micropipetas precisas;
- A leitora deve ser calibrada, de acordo com as especificações do fabricante.

Credenciamento

No Brasil: "Para a realização de testes diagnósticos de brucelose e de tuberculose, o MAPA credencia laboratórios que integram a Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária." – Instrução Normativa nº 34, de 08 de setembro de 2017, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Licenciado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob nº10.343/2020 em 25/06/2020.

Responsável Técnica:

Margareth Carvalho Santos Agottani
CRMV-PR nº 3288

CONSERVAR ENTRE 2 e 8°C

Número do catálogo: B1001-250 (250 testes),
B1001-1000 (1.000 testes)

Proprietário: ELLIE LLC

N114 W19320 Clinton Dr., Germantown, WI 53022, USA.

Fabricante: DOO BIOTEHNIKA IVD

Ratina Kraljevo 36212 Ratina Kraljevo, Ratina 175, Sérvia.

Representante, Importador e Distribuidor:

JMR Trading LTDA.. Rua Mandaguari, 1752,
Pinhais – Paraná

Fone: (41) 3434-2721

info@vpdiagnostico.com.br

www.vpdiagnostico.com.br

PRODUTO IMPORTADO

SUPORTE TÉCNICO

Para suporte técnico e todas as questões regulatórias, vendas e marketing, favor contatar:



JMR TRADING LTDA IMPORTADORA

VP Diagnóstico Distribuidora

Rua Mandaguari, 1752, Pinhais – PR

CNPJ: 11.857.347/0001-71

info@vpdiagnostico.com.br

www.vpdiagnostico.com.br

ellie

Ellie LLC – N114 W19320 Clinton Drive, Unit 5,
Germantown, WI 53022, USA

Phone/Fax: (800) 556-6953 – support@ellielab.com

Esse produto foi desenvolvido em colaboração entre a Agência de Inspeção de Alimentos Canadense e a Diachemix LLC. Exclusivamente licenciado para a Ellie LLC.

GARANTIA

O Proprietário 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 VPDiagnóstico 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 Proprietário 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 Proprietário Ellie LLC.

LIMITAÇÃO DE RESPONSABILIDADE

Em nenhuma circunstância, o Proprietário 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.

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.
- Batista, M.B. Investigação soropidemiológica de *Brucella* spp. em suínos no estado da Bahia. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2016.
- Meirelles-Bartoli, R.B. Avaliação de Testes Sorológicos no Diagnóstico da Brucelose Suína em Amostras Provenientes de um Frigorífico e de um Rebanho Naturalmente Infectado do Estado de São Paulo. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, 2010.