

INSTRUÇÕES DE USO

IFA para *Ehrlichia canis* Kit Anticorpos IgG canino

Número de Catálogo:	ECG-120
Tamanho::	120
testes Armazenamento:	2-8°C

**Método de diagnóstico por Imuno-
fluorescência Indireta para detecção da
classe de anticorpo IgG contra *Ehrlichia*
canis em soro ou plasma canino**

Somente para diagnóstico *in vitro*



1135 E. Truslow Avenue
Fullerton, CA 92831 USA
Phone: +1-714-525-7660
Fax +1-714-525-7614
Email: info@fullerlabs.com
URL: www.fullerlabs.com

Representante exclusivo no Brasil:
Photochart Laboratório de Análises
Clínica Veterinária Ltda.
Av. Evandro Lins e Silva, 840/ Sala 606 –
Barra da Tijuca Rio de Janeiro – RJ – Brasil
CEP 22.631-470
Tel/Fax.: (55) (21) 3433-9062
Email.: photochart.lab@globo.com

INDICAÇÃO DE USO

Teste de Imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos IgG para *E. canis* é destinado para a detecção semi-quantitativa dos anticorpos da classe IgG canina para *Ehrlichia canis*.

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Consiste em lâminas de substrato protegido por uma película de politetrafluoretileno (teflon) nos poços contendo células de macrófagos canino fixado (célula da linhagem DH82), aproximadamente 20-30% das quais estão infectadas com *Ehrlichia canis* e contendo mórula citoplasmática característica. O soro canino é diluído em tampão salino e incubado em poços individuais da lâmina para permitir a reação do anticorpo do paciente com o antígeno Ehrlichial. Após este procedimento, as lâminas são lavadas para remover as proteínas do soro que não reagiram, e o marcador fluorescente (Conjugado) anti-IgG canino é adicionado. Este Conjugado está no tempo permitindo de reação com Complexo Antígeno-Anticorpo. As lâminas são lavadas novamente para remover o Conjugado que não reagiu. Os resultados das reações podem ser visualizados por microscópio de imunofluorescência padrão, onde uma reação positiva é observada como uma definição minuciosa de mórula maçã-verde fluorescente dentro do citoplasma de 10-15% das células em cada campo. A reação negativa é observada também como células avermelhadas ou uma fluorescência diferente da visualizada no poço controle positivo. As reações positivas podem também ser re-testadas em diluições maiores para determinar o aumento da reação e o título final da diluição.

REAGENTES

IFA Ag x 12 **10 lâminas impregnada com substrato**
10 lâminas com 12 poços disfarçados contendo células DH82 canina infectada com *Ehrlichia canis*. As lâminas estão fixadas, embaladas a vácuo e prontas para uso.

CONJ FITC **Conjugado, 2.5 mL**
Frasco dosador de tampa amarela contendo marcador DyLight 488 purificado de coelho anti-IgG canino (cadeia pesada) com soro albumina bovino e contraste azul de Evans.

CONT + **Controle Positivo, 0.5 mL**
Frasco dosador de tampa azul contendo soro canino reativo em uma diluição 1:50. Título final é 1:400.

CONT - **Controle Negativo, 0.5 mL**
Frasco dosador de tampa vermelha contendo soro canino não reativo, fornecido em uma diluição de 1:50

MM **Suporte de Montagem, 1 mL**
Frasco dosador de tampa branca contendo glicerol (50% v/v) em PBS.

BUF WASH PBS **PBS, 1 litro**
Pó adicional suficiente para 1 litro de água destilada para produzir PBS.

ADVERTÊNCIA

1. soro controle deve estar abrigado por agente infeccioso por testes exigidos pela USFDA. Desde que testados não podem assegurar a ausência de agentes infecciosos, contudo, estes reagentes, bem como os soros das espécimes e equipamentos que entram em contato com estas espécimes, devem ser manuseados com boas práticas laboratoriais para evitar contato com a pele e ingestão.
2. O substrato das lâminas são preparados com antígeno quimicamente inativados. Contudo, as lâminas devem ser consideradas potencialmente infecciosa e manuseada de acordo.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Os componentes do KIT devem ser armazenados de 2°C-8°C. Levá-los para a temperatura da sala (20°C-25°C) antes de abrir os frascos e os envelopes das lâminas.

AMOSTRAS

Permitir que a amostra de sangue coagule e o soro seja separado por centrifugação. Transferir o soro assepticamente para recipiente estéril bem fechado. Armazene de 2-8°C. Se o exame demorar mais de 5 dias, congelar a amostra a d -20°C. Espécimes na fase aguda, devem ser recebidas no início da doença, com fase de convalescência deve ser obtido de duas a quatro semanas de intervalo para observar as mudanças de títulos

PROCEDIMENTO

KIT fornece reagentes suficientes e materiais para 120 determinações.

Materiais exigidos mas não fornecidos

- Água destilada ou deionizada
- Frascos de 250 ou 500 ml limpos para PBS
- Tubos de ensaio ou placa de microtítulo para diluições de soro
- Pipeta de precisão
- Laminula de 24X50mm
- Microscópio de Imunofluorescência com filtro para o sistema FITC (excitação máxima do comprimento de onda 490nm, significa a emissão de um comprimento de onda de 530nm) e aumento de 400X
- Banho-maria a 37°C ou incubador
- Câmara úmida para incubar a lâmina

Precauções

- Não utilize os componente após o vencimento
- O Conjugado é fotossensível. Armazene no escuro.
- O Conjugado contem o corante Azul de Evans, o qual pode ser carcinogênico. Evite contato com a pele.
- Reagente líquido contendo thimerosal a 0.01%, o qual pode ser tóxico se ingerido

PROCEDIMENTO DA ANÁLISE

Permita que todas reagentes e soro atinja a temperatura ambiente antes de iniciar o procedimento da amostra

1. Prepare uma diluição 1:50 em PBS para os soros das espécimes. Para o soro positivo encontrado em uma análise prévia, prepare diluições seriais duplas em PBS, iniciando nas diluições (como acima).
2. Além das diluições preparadas do Controle Positivo, as qual é contida em uma diluição em 1:50. Faça diluições em série de Controle contido completamente desdobrando em 16 (1:2; 1:4; 1:8; 1:16). Estas diluições são consideradas 1:100; 1:200; 1:400 e 1:800 quando comparada com um título final específico.
3. Para cada soro diluído, adicione 10µl em um poço da lâmina e marque a localização para referencia. Para cada amostra

executada a diluições de Controle Positivo preparado no passo 2 e uma gota do Controle Negativo para um poço.

4. Coloque as Lâminas em uma câmara úmida e incubar por **30 minutos** a 37± 0,5°C.
5. Remova a câmara úmida da incubadora . Lave bem os poços lâmina com fluxo suave de PBS por 3 vezes. Então permita gotejamento de PBS, conservando no mínimo por 5 minutos nos poços.
6. Misture ou bata levemente no excesso de PBS das lâminas continuando com o gotejamento de PBS e ir para o próximo passo sem permitir que os poços das lâminas sequem.
7. Em cada poço da lâmina adicione 1 gota de Conjugado, então retorne as lâminas para câmara úmida por **30 minutos** incubado a 37± 0,5°C. A incubação deve ser no escuro para proteger o conjugado fotossensível.
8. Lave as lâminas como descrito no item 5 e 6, acima.
9. Adicionar 2-3 gotas do suporte de montagem em cada lâmina e na laminula, removendo as bolhas de ar cuidadosamente que estão abaixo da laminula.
10. Leia as lâminas substrato coradas em aumento de 400X, comparando cada poço para visualizar a intensidade e o aparecimento das inclusões Ehrlichiais observadas nos poços dos Controles Positivo e Negativo. As lâminas podem ser armazenadas a 2-8°C no escuro no máximo de 24 horas.

CONTROLE DE QUALIDADE

• soro Controle Negativo e as diluições do soro Controle Positivo devem ser analisados a cada leitura diária. O poço do soro Controle Negativo é um exemplo de um soro não reativo, com contraste uniforme avermelhado ou delgado, , exceto a coloração esverdeada uniforme. Os poços Controle Positivo devem dar um título final de 1:200 a 1:800. A intensidade da fluorescência a 1:400 pode ser usada como o nível limítrofe exigido para a reação do paciente ser considerada positiva. Se qualquer um dos Controles não reagirem como específicos, a amostra deverá ser considerada como nula, os componentes dos reagentes devem ser revistos todos os passos do procedimento, e a amostra deve repetir o passo #1.

• poço Controle Negativo é um exemplo de fluorescência padrão que têm de ser considerada negativa. Se características visualizadas neste poço, similar a visualizada no poço Controle Positivo, existiu um colapso na técnica e o método deve ser repetido.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Uma reação positiva parece como corpúsculos de inclusão brilhantes, agudo e manchado visualizados no citoplasma das células infectadas. O tamanho, a aparência e a densidade das inclusões podem ser comparadas com as reações dos Controles Positivo e Negativo. A reatividade padrão diferente do que aquela visualizada no Controle Positivo pode ser considerada não-específica.

ESPÉCIMES

Positivo a uma diluição 1:50: Os títulos de IgG de 1:50 e o aumento reflete infecção em um tempo não determinado (soropositivo). O soro positivo deve ser feito para determinar seu título final para comparar com espécimes recentes ou antigas de um mesmo paciente.

Negativo a 1:80: Relatos negativos para anticorpos de *Rickettsia rickettsii*. Além dos soros das espécimes devem ser tirada, se o original foi levado depois de um breve ataque, especialmente se antibiótico terapia for instituída.

Soro Emparelhado: uma aumento no desdobramento quadruplicado em soros com títulos na fase aguda e de convalescência sustenta o diagnóstico de infecção recente.

RESTRICÕES

Ehrlichia canis é antigenicamente relacionado com *Ehrlichia ewingii* e *Ehrlichia chaffeensis*, ambas são patógenos canino. Assim, as diferenciações desses antígenos por títulos de ELISA e IFA, sem isolamento do organismo na cultura ou detecção do PCR, é problemática. Os relatos de outras espécies de *Ehrlichia* são algumas vezes detectados por IFA, mas os títulos são arranjados numa grandeza menor que de encontro a genogrupos antigênicos homólogos.

VALORES EXPERADOS

A prevalência de anticorpos de *Ehrlichia canis* varia de regiões geográficas e das populações que estão sendo testadas.