

INSTRUÇÕES DE USO

IFA para *Anaplasma phagocytophilum* Kit Anticorpos IgG canino

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

Método de diagnóstico por Imuno-fluorescência Indireta para detecção da classe de anticorpo IgG contra *Anaplasma phagocytophilum* 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 *A. phagocytophilum* é destinado para a detecção semi-quantitativa dos anticorpos da classe IgG felina para *Anaplasma phagocytophilum*.

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Ehrlichiose Granulocítica Humana (EGH) foi descrita primeiramente em 1994 por referir se as características de inclusões citoplasmática (mórula) encontrada em neutrófilos do sangue periférico. A resposta sorológica destes pacientes foram descobertas por ser específica para *Ehrlichia equi*, um patógeno conhecido na veterinária. O genótipo inclui a *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophilum* e EGH, têm sido designado como um grupo de espécie única *Anaplasma phagocytophilum*. Este método de IFA utiliza cultura de células infectadas e fixadas para detectar anticorpos canino específicos para este patógeno.

Soros dos pacientes são diluídos em tampão salino e incubados em poços individuais da lâmina para permitir reação dos anticorpos dos pacientes com a fase sólida do antígeno. As lâminas são então lavadas para remover as proteínas do soro que não reagiram, e o marcador fluorescente (Conjugado) anti-IgG felina 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 20-35% 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

REAGENTES

IFA Ag x 12 10 lâminas impregnada com substrato

10 lâminas com 12 poços disfarçados contendo células HL60 infectada com *Anaplasma phagocytophilum*. As lâminas estão fixadas, embaladas a vácuo e prontas para uso.

CONJ FITC Conjugado, 2.0 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 1:80. 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 1:80

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 1:80 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 1:80. Faça diluições em série de Controle contido completamente desdobrando em 16 (1:2; 1:4; 1:8; 1:16). Estas diluições são consideradas 1:160; 1:320; 1:640 e 1:1280 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 37º± 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 37º± 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 Anaplasma 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 1:320 a 1:1280. A intensidade da fluorescência a 1:400 pode ser usada como o nível limitrofe 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 1:80: Os títulos de IgG de 1:80 e o aumento reflete infecção em um tempo não determinado (soropositivo). O soro positivo deve ser refeito 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 *Anaplasma phagocytophilum*. 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

Reações cruzadas com Ehrlichia chaffeensis pela IFA esta variando de fraca a forte, e pode ser diferenciada por uma variedade de testes alternativos incluindo a técnica de western blotting.

VALORES EXPERADOS

O teste de especificidade foi testado em 95 soros de uma região não-endêmica. Todos os 95 destes soro obteve título < 1:80. Vinte soros de um laboratório de referência pública regional também testou por concordância. Todos os 8 soros positivos foram detectados com títulos dentro de uma diluição e os 4 soros negativos tiveram cada < 1:80.

REFERENCIAS

1. Bakken, J. S., J. S. Dumler, S. M. Chen, M. R. Eckman, L. L. Van Etta, and D. H. Walker. 1994. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? JAMA 272:212-218

2. Dumler, J. S., K. M. Asanovich, J. S. Bakken, P. Richter, R. Kimsey, and J. E. Madigan. 1995. Serologic crossreactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and human granulocytic *Ehrlichia*. J. Clin. Microbiol. 33:1098-1103.

3. IJdo, J. W., Y. Zhang, E. Hodzic, L. A. Magnarelli, M. L. Wilson, S. R. Telford III, S. W. Barthold, and E. Fikrig. 1997. The early humoral response in human granulocytic ehrlichiosis. J. Infect. Dis. 176:687-692.

4. Magnarelli, L. A., J. W. IJdo, J. S. Dumler, R. Heimer, and E. Fikrig. 1998. Reactivity of human sera to different strains of granulocytic ehrlichiosis in immunodiagnostic assays. J. Infect. Dis. 178:1835-1838.

5. Walls, J. L., M. Aguero-Rosenfeld, J. S. Bakken, J. L. Goodman, D. Hossain, R. C. Johnson, and J. S. Dumler. 1999. Inter- and intralaboratory comparison of *Ehrlichia equi* and human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent strains for serodiagnosis of HGE by the immunofluorescent-antibody test. J. Clin. Microbiol. 37:2968-2973.