

**Kit para Diagnóstico *in vitro* de Eriiquiose Canina por Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA-TESTE)**

USO VETERINÁRIO

**DESCRIÇÃO DO PRODUTO:**

O kit detecta anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em soros de cães, utilizando proteína recombinante de *Ehrlichia canis* aderida aos orifícios das microplacas. Os soros caninos (controle positivo, negativo e amostras-teste) são incubados nas microplacas sensibilizadas com a proteína. Em seguida adiciona-se o conjugado anti-IgG de cão (molécula total), seguido de lavagem e adição do substrato. Após incubação com o substrato, as amostras-teste positivas e controle positivo apresentam-se com coloração amarela, cuja densidade óptica é determinada pelo leitor de microplaca de ELISA. O teste para detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* é rápido e fornece resultados de especificidade >84% e sensibilidade >92%.

**COMPOSIÇÃO:**

- a) 12 envelopes aluminizados, cada um contendo microplacas de poliestireno com 16 poços (orifícios), sendo 15 poços sensibilizados com proteína recombinante de *Ehrlichia canis*;
- b) 2 frascos de vidro com 1,2 mL cada de conjugado (anti-IgG de cão) - DILUIR;
- c) 1 frasco de vidro com 1,4 mL de soro controle positivo - PRONTO PARA USO;
- d) 1 frasco de vidro com 1,4 mL de soro controle negativo - PRONTO PARA USO;
- e) 1 frasco plástico com 100 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) 20X concentrada - DILUIR;
- f) 1 frasco plástico com 15 mL de solução de parada da reação - PRONTO PARA USO;
- g) 1 frasco plástico com 25 mL de solução de diluição do substrato - PRONTO PARA USO;
- h) 1 frasco de vidro com 2 mL de Tween 20 (Monolaurato de Sorbitan Etoxilado 20 EO) - PRONTO PARA USO;
- i) 4 comprimidos de substrato pNPP - DILUIR;
- j) 2 suportes plásticos para as microplacas;
- k) 2 mapas de placa (cartão de identificação das amostras).

**INDICAÇÃO:**

Diagnóstico *in vitro* da Eriiquiose Canina pelo Método de Ensaio Imunoenzimático Indireto.

**ARMAZENAMENTO:**

Armazenar as microplacas sensibilizadas, conjugado, PBS 20X, solução de parada, solução de diluição do substrato e Tween 20 em temperatura entre 2 a 8 °C. **Não congelar.** Aliquotar os soros controles em volumes de 110 µL em microtubos, tipo eppendorf e mantê-los em temperatura a -20 °C. Os comprimidos do substrato pNPP devem ser armazenados em

temperatura a **-20 °C**. As microplacas são embaladas individualmente. Abrir somente a quantidade necessária no momento do uso.

**Obs:** O kit apresenta quantidade suficiente de reagentes para as reações de diagnóstico, mesmo se as microplacas forem processadas individualmente.

## PRECAUÇÕES:

Em caso de presença de cristais no PBS 20X, recomenda-se aquecê-lo até a completa dissolução dos cristais, para posterior diluição do tampão.

## PREPARO DOS REAGENTES:

### a. Soros controle:

Os soros controles positivo e negativo estão PRONTOS PARA USO, ou seja, devem ser pipetados diretamente dos frascos para os orifícios das microplacas sensibilizadas. Recomenda-se colocá-los, nos primeiros orifícios de cada microplaca.

### b. Preparo do PBS-Tween 20:

Diluir 50 mL do PBS 20X em 950 mL de água destilada ou purificada. Acrescentar 0,5 mL de Tween 20.

### c. Amostras-teste:

As amostras-teste devem ser obtidas através da centrifugação do sangue total coletado do animal a ser diagnosticado. Após centrifugação, o sobrenadante, ou seja, o soro, deve ser coletado em microtubo estéril e mantido em temperatura a **-20 °C**, até o momento do uso. As amostras-teste devem ser diluídas **1:200** em PBS-Tween 20, utilizando-se placa de ELISA não sensibilizada (placa de 96 poços reutilizável) ou microtubos, tipo eppendorf e posteriormente, transferidas para os orifícios das microplacas sensibilizadas com a proteína, com auxílio de uma micropipeta.

O kit possui capacidade **máxima** para a realização de 176 testes (caso utilize de uma só vez, 6 microplacas e desconta-se 8 orifícios: H2, H4, H6, H8, H10 e H12, 1 controle positivo e 1 negativo) e capacidade **mínima** de 156 testes (caso utilize cada microplaca individualmente e desconta-se 18 orifícios, nessa conta considera-se 1 controle positivo, 1 negativo e o branco por cada microplaca e cada microplaca possui 16 poços, restando 13 poços para teste).

Utilize o mapa de placa fornecido para anotar a localização dos soros controles e das amostras-teste.

**Obs:** Os orifícios H2, H4, H6, H8, H10 e H12 não contém a proteína recombinante de *Ehrlichia canis*, servindo apenas para calibração do equipamento leitor de microplaca de ELISA (branco). As microplacas sensibilizadas devem ficar perfeitamente encaixadas no suporte fornecido, para que os orifícios mencionados acima fiquem na posição correta no leitor de microplaca.

### d. Preparo do conjugado (anti-IgG de cão):

Para cada microplaca (16 orifícios), diluir 200 µL do conjugado em 1,8 mL de PBS-Tween 20.

**Obs:** Preparar somente no momento do uso.

### **e. Preparo do substrato pNPP:**

Para cada conjunto de microplacas (6 envelopes aluminizados), diluir 2 comprimidos do substrato pNPP em 10 mL de solução de diluição do substrato. Após completa dissolução do comprimido, preparar alíquotas de 1,6 mL em frascos tipo âmbar ou microtubos tipo eppendorf, envolvidos em papel aluminizado, protegendo-o da luz e conservar em temperatura a **-20 °C**.

**Obs:** Caso o volume de amostras seja pequeno, diluir apenas 1 comprimido em 5 mL de solução de diluição do substrato, alíquotar e armazenar a **-20 °C**.

### **PROCEDIMENTO:**

1. Antes de iniciar o ensaio, deixe os soros controles, as amostras testes e apenas as microplacas que serão utilizadas, em temperatura ambiente por 5 a 10 minutos.
2. Adicione **100 µL** dos soros controles positivo e negativo e, **100 µL** das amostras-teste diluídas nos respectivos poços (orifícios), registrando-se a posição de cada um conforme marcação nas microplacas. Não adicionar nos orifícios H2, H4, H6, H8, H10 e H12.
3. Incube as microplacas por 1 hora em estufa a 37 °C, em câmara úmida.
4. Lave as microplacas três vezes com PBS-Tween 20. Após a última lavagem, bater as microplacas sobre uma superfície plana, acolchoada com várias camadas de papel absorvente. Secar bem. Não deixar bolhas dentro dos poços.
5. Adicione **100 µL/poço** do conjugado (anti-IgG de cão) diluído. Não adicionar nos orifícios H2, H4, H6, H8, H10 e H12.
6. Incube as microplacas por 1 hora em estufa a 37 °C, em câmara úmida.
7. Retirar a solução de substrato do -20 °C, previamente alíquotado e deixá-lo em temperatura ambiente para o passo 9.
8. Repetir o procedimento de lavagem e secagem das microplacas conforme item 4.
9. Adicione **100 µL/poço** da solução de substrato. Não adicionar nos orifícios H2, H4, H6, H8, H10 e H12.
10. Envolver as microplacas em papel alumínio, incubando-as em temperatura ambiente de 30 a 45 minutos.
11. Adicione **50 µL/poço** da solução de parada da reação. Não adicionar nos orifícios H2, H4, H6, H8, H10 e H12.
12. Faça a leitura das microplacas em leitor de microplaca de ELISA com filtro de 405 nm.

### **INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS:**

- Calcular o Índice de Corte (I.C.)

O I.C. é a média da densidade óptica (D.O.) do soro controle negativo, multiplicada pelo fator 2,5.

- As amostras que apresentarem coloração amarela intensa e densidade óptica (D.O.) igual ou maior que o I.C., serão consideradas positivas para *Ehrlichia canis*.

- As amostras que não apresentarem coloração amarela intensa e D.O. menor que o I.C., serão consideradas negativas para *Ehrlichia canis*.

## **MATERIAIS NECESSÁRIOS PARA A REALIZAÇÃO DO TESTE E NÃO FORNECIDOS NO KIT:**

1. Leitor de microplaca de ELISA com capacidade de absorbância em 405 nm de comprimento de onda;
2. Estufa de incubação para temperatura de 37 °C;
3. Micropipetas para os seguintes volumes: 1 µL; 50 µL; 100 µL; 110 µL; 400 µL; 500 µL; 800 µL e 1000 µL;
4. Papel absorvente para secar as microplacas;
5. Cronômetro ou relógio;
6. Frasco para estocar a solução de PBS diluída;
7. Água destilada ou purificada;
8. Ponteiros descartáveis de: 10 µL, 200 µL e 1000 µL;
9. Proveta para volumes de 50 mL e 1000 mL;
10. Microtubos (tipo eppendorf) de 2 mL para diluição do conjugado e para alíquotas da solução de substrato;
11. Microtubos (tipo eppendorf) para diluição dos soros ou similares (placa 96 poços reutilizável).

## **USO DE PARAMENTAÇÃO:**

Durante a realização dos testes recomenda-se que o colaborador esteja paramentado com avental de manga longa e luva descartável.

## **DESCARTE:**

Todo material utilizado durante os testes e os resíduos gerados devem ser descartados em lixeira apropriada para material infectante (lixo biológico).

## **MODO DE CONSERVAÇÃO:**

- Seguir as recomendações de armazenamento;
- Manter ao abrigo da luz direta e à umidade excessiva.

**Licenciado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob nº 10.512/2022 em 19/04/2022**

### **PROPRIETÁRIO E FABRICANTE:**

Imunodot Diagnósticos Ltda  
Rua Dr. Mário de Campos, 1150 • Jardim São Marcos I  
CEP: 14887-200 • Jaboticabal/SP  
Contato: (16) 3203 8847  
E.mail: contato@imunodot.com.br  
www.imunodot.com.br  
CNPJ/MF nº 05.870.841/0001-73

### **RESPONSÁVEL TÉCNICO:**

Celio Raimundo Machado – CRMV/SP nº 2812

