

Manual do *pigtype*[®] Toxoplasma Ab



1 (ref.º 273401)



5 (ref.º 273403)



20 (ref.º 273405)*

Para a detecção de anticorpos
de *Toxoplasma gondii*

Registado em conformidade com § 17c da Lei Alemã
relativa a Doenças de Animais (FluB 564)

REF

273401, 273403, 273405



QIAGEN Leipzig GmbH, Deutscher Platz 5b, 04103 Leipzig,
Alemanha



* Apenas disponível sob solicitação.

Tecnologias de amostras e testes da QIAGEN

A QIAGEN é o principal fornecedor de tecnologias inovadoras de amostras e testes, permitindo isolar e detectar o conteúdo de qualquer amostra biológica. Os avançados produtos e serviços de alta qualidade da nossa empresa garantem o sucesso, desde a amostra até ao resultado.

A QIAGEN é uma empresa de referência em matéria de:

- Purificação de ADN, ARN e proteínas
- Testes de ácidos nucleicos e proteínas
- Investigação em microRNA e RNAi
- Automatização de tecnologias de amostras e testes

A nossa missão permitir-lhe-á alcançar o sucesso, bem como resultados notáveis. Para mais informações, visite-nos em www.qiagen.com.

Além disso, a QIAGEN fornece soluções moleculares de alta qualidade, sensíveis e fáceis de utilizar, que permitem a detecção de agentes patogénicos veterinários e a investigação de agentes patogénicos animais. O portfólio veterinário da QIAGEN inclui uma vasta gama de ensaios de PCR específicos de agentes patogénicos e um portfólio ELISA extenso e em crescimento. Para mais informações, visite-nos em www.qiagen.com/Animal-and-Veterinary-Testing.

Índice

Conteúdo do kit	4
Utilização prevista	5
Símbolos	5
Armazenagem	6
Informações de segurança	6
Controlo de qualidade	7
Introdução	8
Princípio	9
Equipamento e reagentes a serem fornecidos pelo utilizador	10
Precauções gerais	11
Protocolo:	
■ ELISA	13
Interpretação dos dados	15
Critérios de validação	15
Guia de resolução de problemas	18
Informações para encomendar	19
Guia rápido	22
Interpretação de dados para porcos, ovelhas, cabras, cães, gatos e raposas	23
Interpretação de dados para javalis e bovinos	23

Conteúdo do kit

<i>pigtype</i> Toxoplasma Ab			
Ref.^a	273401	273403	273405*
Número de placas	1	5	20
Placa de teste: placa de microtitulação com 96 poços, revestidos com antígeno <i>Toxoplasma</i> não infeccioso	1	5	20
Sample diluent (diluyente de amostras), pronto a usar	1 x 60 ml	2 x 125 ml	2 x 500 ml
Negative Control (controlo negativo), pronto a usar	1 x 1,5 ml	1 x 3,5 ml	2 x 3,5 ml
Positive Control (controlo positivo), pronto a usar	1 x 1,5 ml	1 x 3,5 ml	2 x 3,5 ml
Wash buffer (tampão de lavagem) (10x)	1 x 125 ml	2 x 125 ml	2 x 500 ml
Conjugate (conjugado), pronto a usar	1 x 12 ml	1 x 60 ml	1 x 240 ml
TMB substrate (substrato de TMB), pronto a usar	1 x 12 ml	1 x 60 ml	1 x 240 ml
Stop solution (solução de paragem), pronta a usar	1 x 12 ml	1 x 60 ml	1 x 240 ml
Manual	1	1	1

* Apenas disponível sob solicitação.

Utilização prevista

O *pigtype* Toxoplasma Ab é um ELISA específico e sensível para a detecção de anticorpos de *Toxoplasma gondii* em amostras de soro, plasma e mioglobina de porcos e javalis (suínos) e em amostras de soro e de plasma de bovinos, ovinos, caprinos, felinos e canídeos (incluindo vacas, ovelhas, cabras, gatos, cães e raposas). O kit de testes também pode ser utilizado com outras espécies de mamíferos. O kit foi aprovado pelo Friedrich-Loeffler-Institut e registado em conformidade com § 17c da Lei Alemã relativa a Doenças de Animais (Fl-B 564) para utilização na Alemanha para procedimentos de diagnóstico veterinário. Apenas para uso veterinário.

Símbolos



<N>

Contém reagentes para <N> placas



Fabricante legal



Número de lote



Prazo de validade



Limites de temperatura de armazenamento



Manual



Ref.^o



Número do material



Proteger da luz



Para amostras de porcos, bovinos, cabras, ovelhas, gatos e cães

Armazenagem

Os componentes do Kit *pigtype* Toxoplasma Ab ELISA devem ser armazenados entre 2 e 8 °C e mantêm-se estáveis até ao prazo de validade indicado no rótulo. O tampão de lavagem (10x) e a solução de paragem podem ser armazenados à temperatura ambiente (18 a 25 °C) para evitar a cristalização de sais. Se forem fornecidas tiras de teste com o kit, armazene as tiras de teste restantes na bolsa de folha de alumínio novamente selada com dessecante entre 2 e 8 °C até à utilização seguinte. As tiras de teste podem ser armazenadas, no mínimo, durante 6 semanas após a abertura da bolsa de placas.

Informações de segurança

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (MSDS) apropriadas. Estas estão disponíveis online no formato compacto e prático PDF em www.qiagen.com/safety, onde pode procurar, visualizar e imprimir as MSDS de cada kit QIAGEN e componente do kit.



ATENÇÃO: a solução de paragem contém 0,5 M de ácido sulfúrico.

Todos os resíduos de amostras e objectos que tenham entrado em contacto com amostras devem ser desinfectados ou eliminados como material potencialmente infeccioso.

Informações de emergência 24 horas

Emergência química ou assistência a acidentes disponível 24 horas por dia por parte de:

CHEMTREC

EUA e Canadá ■ Tel.: 1-800-424-9300

Fora dos EUA e Canadá ■ Tel.: +1-703-527-3887 (aceites chamadas a cobrar no destino)

Controlo de qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão de Qualidade Total certificado pela norma ISO da QIAGEN, todos os lotes do *pigtype* Toxoplasma Ab são testados quanto às especificações predeterminadas, a fim de garantir uma qualidade constante do produto.

Introdução

O *pigtype* Toxoplasma Ab é uma solução altamente específica e sensível para a detecção de anticorpos de *Toxoplasma gondii*. O kit permite uma detecção rápida e fiável de anticorpos de *Toxoplasma gondii* em amostras de soro, plasma e mioglobina de porcos e javalis (suínos) e em amostras de soro e de plasma de bovinos, ovinos, caprinos, felinos e canídeos (incluindo vacas, ovelhas, cabras, gatos, cães e raposas).

A toxoplasmose é uma doença zoonótica causada pelo parasita protozoário *Toxoplasma gondii*, que se encontra globalmente disseminado em animais de sangue quente, incluindo o ser humano. Os gatos e os demais felídeos desempenham um papel importante na epidemiologia da toxoplasmose, uma vez que são o hospedeiro definitivo e, conseqüentemente, o agente contagiante dos oócitos de *Toxoplasma gondii*. A infecção primária em humanos ocorre por ingestão de oócitos esporulados provenientes de fezes de gatos recém-infectados. Outra fonte de infecção pode ser a carne de porco crua ou mal cozida que contenha oócitos de *Toxoplasma*.

Princípio

A placa de teste de microtitulação é revestida com antigénio *Toxoplasma* recombinante. Durante a incubação das amostras, os anticorpos específicos de *Toxoplasma* ligam-se ao antigénio imobilizado. O material não ligado é removido através de lavagem. O conjugado de peroxidase de rábano (HRP) multi-espécie detecta anticorpos no soro ligados ao antigénio. O conjugado não ligado é removido através de lavagem. É iniciada uma reacção colorimétrica adicionando solução de substrato, interrompendo-se a reacção após 10 minutos. Na presença de anticorpos específicos de *Toxoplasma*, dentro da amostra, a HRP catalisa um desenvolvimento de cor azul, que se torna amarelo após adicionar a solução de paragem. A absorvância (OD) mede-se num espectrofotómetro. Os valores de OD correlacionam-se com a concentração de anticorpos específicos de *Toxoplasma* da amostra.

Equipamento e reagentes a serem fornecidos pelo utilizador

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (MSDS) apropriadas, disponíveis no fornecedor do produto.

- Gobelés
- Provetas
- Pipetas (ajustáveis)
- Pipetas multicanal (ajustáveis)
- Folha adesiva ou de alumínio para cobrir a placa de testes
- Dispositivo para administração e aspiração de solução de lavagem (opcional)
- Leitor de absorvância de placa de microtitulação
- Tubos ou placas para diluir as amostras
- Água destilada

Precauções gerais

○ utilizador deve ter sempre em atenção o seguinte:

- Não exponha a solução de substrato de TMB a luz intensa ou à luz do sol durante a execução do teste.
- Os componentes do kit de teste não devem ser contaminados ou misturados com componentes de outros lotes.
- Não utilize componentes do kit de teste que tenham excedido o prazo de validade.
- A água de sistemas de intercâmbio de iões utilizada para diluição da solução de lavagem (10x) pode interferir com o ensaio se não for suficientemente pura. É indicada a água duplamente destilada ou altamente purificada (Milli-Q).
- A utilização de equipamentos de vidro limpos, uma pipetagem e lavagem cuidadosas durante o teste e uma estrita observância dos tempos de incubação indicados são essenciais para obter resultados de teste precisos.

O que fazer antes de iniciar o procedimento

- Coloque os reagentes à temperatura ambiente (18 a 25 °C) imediatamente antes da utilização. Em caso de cristais de sais precipitados no tampão de lavagem (10x), dissolva-os com agitação e aquecimento suaves.

Tampão de lavagem: dilua o tampão de lavagem (10x) 1:10 em água destilada, por ex., para uma placa de teste dilua 25 ml de tampão de lavagem (10x) em 225 ml de água destilada e misture.

Soro/plasma: antes da análise das amostras, em amostras de soro/plasma, dilua **1:100** em diluente de amostras (por ex., dilua 5 µl de amostra em 495 µl de diluente de amostras) e misture bem. Utilize tubos de plástico ou placas de microtitulação não revestidas para a diluição. Substitua as pontas das pipetas entre amostras.

Mioglobina: antes da análise das amostras, em amostras de mioglobina, dilua **1:10** em diluente de amostras (por ex., dilua 25 µl de amostra em 225 µl de diluente de amostras) e misture bem.

Em alternativa, é possível diluir as amostras de mioglobina directamente na placa de teste. Coloque 90 µl de diluente de amostra em cada poço. Adicione 10 µl de amostra de mioglobina não diluída e misture bem (veja o procedimento 1a).

Extraia amostras de mioglobina de aproximadamente 10 g de tecido contaminado isento de gordura e de sangue, do pilar do diafragma, num dispositivo de colheita de mioglobina, congelando e descongelando (em alternativa, as amostras de carne podem ser armazenadas a -20 °C durante vários meses até serem analisadas). Retire a mioglobina libertada pelas amostras descongeladas e armazene entre 2 e 8 °C. As amostras armazenadas entre 2 e 8 °C devem ser analisadas num prazo de 24 horas.

- Os **Controlos** estão prontos a usar e não necessitam de diluição.

Protocolo: ELISA

Leia “O que fazer antes de iniciar o procedimento”, na página 11.

Procedimento

- 1. Pipete 100 µl de cada um dos controlos negativos (em duplicado) e dos controlos positivos (em duplicado) prontos a usar, e as amostras diluídas 1:10 de carne/ou as amostras diluídas 1:100 de soro ou plasma para os poços da placa de testes.**
- 1a. Alternativamente, pipete 90 µl de diluente de amostras para cada poço de amostra e adicione 10 µl da amostra não diluída de mioglobina. Misture bem.**

Registe as posições dos controlos e das amostras num protocolo de teste. Misture, utilizando um agitador de placas ou por repetida aspiração e distribuição do líquido. Cubra a placa de testes.
- 2. Incube durante 60 min. à temperatura ambiente (18 a 25 °C) ou durante a noite (12 a 18 horas) entre 2 e 8 °C.**
- 3. Remova a solução dos poços através de aspiração ou drenagem.**
- 4. Lave cada poço 3 vezes com 300 µl de tampão de lavagem preparado. Remova o tampão após cada uma das lavagens.**
- 5. Pipete 100 µl de conjugado pronto a usar em cada poço e incube durante 30 min. à temperatura ambiente.**
- 6. Remova a solução dos poços através de aspiração ou drenagem.**

7. Lave cada poço 3 vezes com 300 µl de tampão de lavagem preparado. Remova o tampão após cada uma das lavagens.
8. Pipete 100 µl de solução de substrato de TMB em cada um dos poços.
9. Incube durante 10 min. à temperatura ambiente, no escuro. Inicie a cronometragem após o primeiro poço ser enchido.
10. Interrompa a reacção adicionando 100 µl de solução de paragem por poço. Adicione a solução de paragem na mesma ordem em que adicionou a solução de substrato.
11. Meça a OD no leitor de placas a 450 nm dentro de 20 min. após interromper a acção.

Opcionalmente pode medir a um comprimento de onda de referência (620 a 650 nm).

Interpretação dos dados

Critérios de validação

Os resultados serão válidos se forem satisfeitos os seguintes critérios:

- O valor médio (MV) do valor medido de OD do controlo positivo (PC) tem de ser $\geq 0,7$
- O valor médio (MV) do valor medido de OD do controlo negativo (NC) tem de ser $\leq 0,2$ utilizando o **protocolo curto**
- O valor médio (MV) do valor medido de OD do controlo negativo (NC) tem de ser $\leq 0,4$ utilizando o **protocolo de um dia para o outro**

Em caso de ensaios inválidos, o teste deve ser repetido após uma revisão profunda das instruções de utilização.

Cálculo

Calcule o MV da OD medida para o controlo negativo (NC) e para o controlo positivo (PC).

O rácio (S/P) de OD de amostra por OD média do controlo positivo calcula-se segundo a seguinte equação:

$$S/P = \frac{OD_{\text{amostra}} - MV OD_{\text{NC}}}{MV OD_{\text{PC}} - MV OD_{\text{NC}}}$$

Interpretação dos resultados

Para amostras de porcos, ovelhas, cabras, raposas, cães e gatos

Protocolo curto (incubação de 60 min. da amostra)

São positivas as amostras com rácio S/P $\geq 0,3$.

Foram detectados anticorpos específicos de *Toxoplasma gondii*.

São negativas as amostras com rácio S/P $< 0,3$.

Não foi possível detectar anticorpos específicos de *Toxoplasma gondii*.

Protocolo de um dia para o outro (incubação da amostra durante a noite)

São positivas as amostras com rácio S/P $\geq 0,5$.

Foram detectados anticorpos específicos de *Toxoplasma gondii*.

São negativas as amostras com rácio S/P $< 0,5$.

Não foi possível detectar anticorpos específicos de *Toxoplasma gondii*.

Para amostras de javalis e de bovinos

Protocolo curto (incubação de 60 min. da amostra)

São positivas as amostras com rácio S/P $\geq 0,2$.

Foram detectados anticorpos específicos de *Toxoplasma gondii*.

São negativas as amostras com rácio S/P $< 0,2$.

Não foi possível detectar anticorpos específicos de *Toxoplasma gondii*.

Protocolo de um dia para o outro (incubação da amostra durante a noite)

São positivas as amostras com rácio S/P $\geq 0,4$.

Foram detectados anticorpos específicos de *Toxoplasma gondii*.

São negativas as amostras com rácio S/P $< 0,4$.

Não foi possível detectar anticorpos específicos de *Toxoplasma gondii*.

Guia de resolução de problemas

Os cientistas da Assistência Técnica da QIAGEN estão sempre prontos a responder a qualquer questão que possa ter sobre as informações e/ou protocolos constantes deste manual ou sobre as tecnologias de amostras e testes (para informações de contacto, consulte o verso do manual ou visite-nos em www.qiagen.com).

Informações para encomendar

Produto	Conteúdo	Ref.º
<i>pigtype</i> Toxoplasma Ab (1)	Para 96 reacções: 1 placa de teste (tiras), tampão de lavagem, diluente de amostras, controlo positivo, controlo negativo, conjugado, solução de substrato de TMB, solução de paragem	273401
<i>pigtype</i> Toxoplasma Ab (5)	Para 480 reacções: 5 placas de teste (tiras), tampão de lavagem, diluente de amostras, controlo positivo, controlo negativo, conjugado, solução de substrato de TMB, solução de paragem	273403
<i>pigtype</i> Toxoplasma Ab (20)*	Para 1920 reacções: 20 placas de teste (sólido), tampão de lavagem, diluente de amostras, controlo positivo, controlo negativo, conjugado, solução de substrato de TMB, solução de paragem	273405
Produtos relacionados		
<i>pigtype</i> Salmonella Ab (5)†	Para 480 reacções: 5 placas de teste (tiras), tampão de lavagem, diluente de amostras, controlo positivo, controlo negativo, conjugado, solução de substrato de TMB, solução de paragem	273003

* Apenas disponível sob solicitação.

† Disponíveis outros tamanhos de kit; consulte www.qiagen.com.

Produto	Conteúdo	Ref.ª
<i>pigtype</i> Yersinia Ab (1)*	Para 96 reacções: 1 placa de teste (tiras), tampão de lavagem, diluente de amostras, controlo positivo, controlo negativo, conjugado, solução de substrato de TMB, solução de paragem	273803
<i>pigtype</i> Trichinella Ab (5)*	Para 480 reacções: 5 placas de teste (tiras), tampão de lavagem, diluente de amostras, controlo positivo, controlo negativo, conjugado, solução de substrato de TMB, solução de paragem	273503
<i>pigtype</i> PRRSV Ab (5)*†	Para 480 reacções: 5 placas de teste (tiras), tampão, controlo positivo, controlo negativo, conjugado, solução de substrato de TMB, solução de paragem	272703

* Disponíveis outros tamanhos de kit; consulte www.qiagen.com.

† Homologação por parte do FII pendente.

A QIAGEN oferece uma gama de kits ELISA e kits de PCR em tempo real e RT-PCR em tempo real para a detecção de agentes patogénicos animais. Visite www.qiagen.com/Animal-and-Veterinary-Testing para mais informações sobre o *bactotype*[®], *cador*[®], *cattletype*[®], *flocktype*[®], *pigtype* e *virotype*[®].

Para informações actualizadas sobre licenciamento e avisos legais específicos do produto, consulte o respectivo guia ou o manual do utilizador do kit QIAGEN. Os manuais de instruções do kit QIAGEN e os manuais do utilizador estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser pedidos à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Guia rápido

Diluição de amostras:

Soro/plasma 1:100

Mioglobina 1:10

Passo	Protocolo curto	Protocolo de um dia para o outro
1. Amostra		100 µl/poço
2. Incubação	60 min. à temperatura ambiente	De um dia para o outro entre 2 e 8 °C
3. Lavagem		3 x 300 µl
4. Conjugado		100 µl/poço
5. Incubação	30 min. à temperatura ambiente	
6. Lavagem		3 x 300 µl
7. TMB		100 µl/poço
8. Incubação	10 min. à temperatura ambiente	
9. Paragem		100 µl/poço
10. Leitura		450 nm

Interpretação de dados para porcos, ovelhas, cabras, cães, gatos e raposas

	Negativo	Positivo
Protocolo curto	S/P <0,3	S/P ≥0,3
Protocolo de um dia para o outro	S/P <0,5	S/P ≥0,5

Interpretação de dados para javalis e bovinos

	Negativo	Positivo
Protocolo curto	S/P <0,2	S/P ≥0,2
Protocolo de um dia para o outro	S/P <0,4	S/P ≥0,4

Notas

Notas

Notas

Marcas comerciais: QIAGEN®, *bactotype*®, *cador*®, *cattletype*®, *flocktype*®, *pigtype*®, *virotypes*® (Grupo QIAGEN). Os nomes registados, marcas comerciais, etc. utilizados neste documento, mesmo quando não especificamente indicados como tal, não deverão ser considerados como não protegidos pela legislação.

A utilização deste produto implica a aceitação dos seguintes termos por parte de qualquer comprador ou utilizador do produto:

1. O produto deverá ser usado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e com o presente manual e recorrendo à utilização exclusiva de componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incluir os componentes englobados neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, no presente manual, e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com. Alguns dos referidos protocolos adicionais foram fornecidos por utilizadores QIAGEN para utilizadores QIAGEN. Os referidos protocolos não foram testados de forma exaustiva ou otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não assegura nem garante que os referidos protocolos não infringem os direitos de terceiros.
2. Salvo em licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não presta qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este kit e os seus componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, renovados nem ser objecto de revenda.
4. A QIAGEN não se responsabiliza especificamente por quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, salvo as expressamente declaradas.
5. O comprador e utilizador do kit concorda em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir ou facilitar quaisquer dos actos proibidos acima mencionados. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de Licença Limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas de tribunal e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Contrato de Licença Limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou aos seus componentes.

Para obter os termos de licença actualizados, consulte www.qiagen.com.

© 2013 QIAGEN, todos os direitos reservados.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

