

Manual do flocktype[®] Mycoplasma Mg Ab



2 (ref.º 274502)



5 (ref.º 274503)*

Para a detecção de anticorpos de
Mycoplasma gallisepticum

Registado em conformidade com § 17c da Lei Alemã
relativa a Doenças de Animais (FluB 437)

REF

274502, 274503*



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	7
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	17
Informações para encomendar	18
Guia rápido	21
Interpretação dos dados	21

Conteúdo do kit

flocktype Mycoplasma Mg Ab		
Ref.^o	274502	274503*
Número de placas	2	5
Placa de teste: placa de microtitulação com 96 poços, revestidos com antigénio Mg não infeccioso	2	5
Sample diluent (diluyente de amostras), pronto a usar	1 x 125 ml	2 x 125 ml
Negative Control (controlo negativo), pronto a usar	1 x 3,5 ml	1 x 3,5 ml
Positive Control (controlo positivo), pronto a usar	1 x 3,5 ml	1 x 3,5 ml
Wash buffer (tampão de lavagem) (10x)	1 x 125 ml	2 x 125 ml
Conjugate (conjugado), pronto a usar	1 x 24 ml	1 x 60 ml
TMB substrate (substrato de TMB), pronto a usar	1 x 24 ml	1 x 60 ml
Stop solution (solução de paragem), pronta a usar	1 x 24 ml	1 x 60 ml
Manual	1	1

* Apenas disponível sob solicitação.

Utilização prevista

O *flocktype Mycoplasma Mg Ab* é um ELISA específico e sensível para a detecção de anticorpos de *Mycoplasma gallisepticum* em amostras de soro e plasma de galinhas e perus. O kit foi aprovado pelo Friedrich-Loeffler-Institut e registado em conformidade com § 17c da Lei Alemã relativa a Doenças de Animais (Flu-B 437) para utilização na Alemanha para procedimentos de diagnóstico veterinário. Apenas para uso veterinário.

Símbolos



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 galinhas e perus

Armazenagem

Os componentes do *flocktype* Mycoplasma Mg 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 *flocktype Mycoplasma Mg Ab* são testados quanto às especificações predeterminadas, a fim de garantir uma qualidade constante do produto.

Introdução

O *flocktype Mycoplasma Mg Ab* é uma solução altamente específica e sensível para a detecção de anticorpos de *Mycoplasma gallisepticum* (*M. gallisepticum*) em amostras de soro e plasma de galinhas e perus.

A *M. gallisepticum* encontra-se globalmente disseminada e causa doenças respiratórias crónicas, diminuição do crescimento e da produção de ovos em aves. A morbidade e a mortalidade podem variar muito e dependem das condições de stress e de infecções secundárias. Os *Mycoplasmas* aderem ao epitélio respiratório e aos eritrócitos. A resposta imunológica celular é fulcral em infecções por *M. gallisepticum*, apesar de a produção de anticorpos específicos poder também ser induzida por infecções e vacinação.

O *flocktype* Mycoplasma Mg Ab utiliza uma proteína membranar de *Mycoplasma gallisepticum* preparada pela tecnologia recombinante como antigénio. Esta proteína é altamente conservada entre as estirpes de *Mycoplasma gallisepticum* e é fortemente imunogénica.

O *flocktype* Mycoplasma Mg, em combinação com o software FlockSoft™, tem capacidade para calcular a titulação de anticorpos em amostras de galinhas/perus e de representar os resultados quantitativamente.

Princípio

A placa de microtitulação é revestida com uma proteína recombinante específica de *M. gallisepticum*. Durante a incubação das amostras, os anticorpos específicos de Mg ligam-se ao antígeno imobilizado. O material não ligado é removido através de lavagem. O conjugado anti-IgY-HRP detecta anticorpos no soro ligados ao antígeno. 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 Mg, 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 Mg 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

O 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 **1:500** em diluente de amostras (por ex., dilua 1 µl de amostra em 499 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.

Alternativamente, as amostras de soro/plasma podem ser diluídas a partir de uma pré-diluição (1:50 em diluente de amostras) directamente na placa de teste (ver o passo 1a).

- 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 1:500 para os poços da placa de teste.**
- 1a. Alternativamente, pipete 90 µl de diluente de amostras para cada poço de amostra e adicione 10 µl da amostra pré-diluída 1:50. Misture bem.**

Registe as posições dos controlos e das amostras num protocolo de teste. Recomenda-se a utilização de uma pipeta multicanal para transferência de amostras. Cubra a placa de testes.

- 2. Incube durante 30 minutos à temperatura ambiente (18 a 25 °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 (18 a 25 °C). Cubra a placa de testes.**
- 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 $\leq 0,2$

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 NC e para o PC.

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

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

Os pontos finais da titulação são calculados a partir do rácio S/P a uma diluição de 1:500 utilizando a equação seguinte:

$$\text{Título } \log_{10} = 1,12 (S/P \log_{10}) + 3,83$$

Interpretação dos resultados

São negativas as amostras com rácio S/P <0,1.

Não foi possível detectar anticorpos específicos de *M. gallisepticum*.

As amostras com rácio S/P $\geq 0,1$ e <0,2 são duvidosas.

Os resultados duvidosos devem ser agrupados com a maioria dos resultados positivos ou negativos. Recomendamos repetir os testes com resultados duvidosos após algumas semanas.

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

Foram detectados anticorpos específicos de *M. gallisepticum*.

Para resultados sorológicos de diagnóstico, recomendamos identificar o agente patogénico obtido a partir dos esfregaços bronquiais do PCR em tempo real (por ex., Kit *bactotype*[®] Mycoplasma Mg/Ms PCR).

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>flocktype</i> Mycoplasma Mg Ab (2)	Para 192 reacções: 2 placas de teste (tiras), tampão de lavagem, diluente de amostras, controlo positivo, controlo negativo, conjugado, solução de substrato de TMB, solução de paragem	274502
<i>flocktype</i> Mycoplasma Mg Ab (5)*	Para 480 reacções: 5 placas de teste, tampão de lavagem, diluente de amostras, controlo positivo, controlo negativo, conjugado, solução de substrato de TMB, solução de paragem	274503
Produtos relacionados		
<i>flocktype</i> Mycoplasma Ms Ab (2)†	Para 192 reacções: 2 placas de teste (tiras), tampão de lavagem, diluente de amostras, controlo positivo, controlo negativo, conjugado, solução de substrato de TMB, solução de paragem	274602
<i>flocktype</i> Mycoplasma Mg/Ms Ab (5)†	Para 480 reacções: 5 placas de teste, tampão de lavagem, diluente de amostras, controlo positivo, controlo negativo, conjugado, solução de substrato de TMB, solução de paragem	274803

* Apenas disponível sob solicitação.

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

Produto	Conteúdo	Ref.ª
<i>bactotype</i> Mycoplasma Mg/Ms PCR Kit (96)*	Para 96 reacções: mistura principal, controlo positivo, controlo negativo	288105
<i>flocktype</i> IBV Ab (2)*	Para 192 reacções: 2 placas de teste (tiras), tampão de lavagem, diluente de amostras, controlo positivo, controlo negativo, conjugado, solução de substrato de TMB, solução de paragem	274302
<i>flocktype</i> IBDV Ab (2)*	Para 192 reacções: 2 placas de teste (tiras), tampão de lavagem, diluente de amostras, controlo positivo, controlo negativo, conjugado, solução de substrato de TMB, solução de paragem	274202
<i>flocktype</i> AIV Ab (2)*	Para 192 reacções: 2 placas de teste (tiras), tampão de lavagem, diluente de amostras, controlo positivo, controlo negativo, conjugado, solução de substrato de TMB, solução de paragem	274012
<i>flocktype</i> NDV Ab (2)*	Para 192 reacções: 2 placas de teste (tiras), tampão de lavagem, diluente de amostras, controlo positivo, controlo negativo, conjugado, solução de substrato de TMB, solução de paragem	275002

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

Produto	Conteúdo	Ref.ª
<i>flocktype</i> Salmonella Ab (2)*	Para 192 reacções: 2 placas de teste (tiras), tampão de lavagem, diluente de amostras, controlo positivo, controlo negativo, conjugado, solução de substrato de TMB, solução de paragem	275702

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.

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

Guia rápido

Diluição de amostras:
Soro/plasma 1:500

Passo	
1. Amostra	100 µl/poço
2. Incubação	30 min. à temperatura ambiente
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 dos dados

Negativo	Duvidoso	Positivo
S/P <0,1	S/P ≥0,1 e <0,2	S/P ≥0,2

Notas

Marcas comerciais: QIAGEN®, *bactotype*®, *cador*®, *cattletype*®, *flocktype*®, FlockSoft™, *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 optimizados 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

