

VETLISA BABESIA IgG

REF VET038

INSTRUÇÕES DE USO USO VETERINÁRIO

FINALIDADE

Teste para determinação qualitativa de anticorpos IgG contra *Babesia canis* em soro ou plasma de cães, por ensaio imunoenzimático de fase sólida, em microplaca. Somente para diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou ensaio imunoenzimático.

O VETLISA Babesia IgG é um ensaio imunoenzimático em fase sólida, baseado no princípio de imunocaptura para a detecção qualitativa de anticorpos IgG contra *Babesia canis* em soro ou plasma. Anticorpos contra *Babesia canis* presentes na amostra, se ligam ao antígeno recombinante de *Babesia canis*, que reveste a microplaca, formando complexos imobilizados: antígeno *Babesia canis* anticorpos anti *Babesia canis*. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados. O conjugado, formado por anticorpo anti-IgG de cão ligado a peroxidase, se liga ao complexo antígeno-anticorpo imobilizado na placa. Após a segunda incubação, a microplaca é lavada e incubada com substrato. A intensidade da cor azul produzida pela adição do substrato é proporcional a quantidade de anticorpos contra o *Babesia canis* presentes na amostra. A solução de parada é adicionada para finalizar a reação, promovendo uma mudança de cor para amarelo, medida em um leitor de microplacas.

COMPONENTES DO KIT

- 1- Placa Sensibilizada** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Placa de Poliestireno, dividida em 12 tiras de 8 poços cada, impregnada com antígeno de *Babesia canis*.
- 2- Conjugado Concentrado (100x)** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução de anticorpo anti-IgG de cão ligado à Peroxidase.
- 3- Lavagem Concentrada (20x)** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução Tampão Fosfato, surfactante e conservante.
- 4- Diluente** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução Tampão, surfactante, estabilizante e conservante.
- 5- Substrato TMB** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução contendo Tetrametilbenzidina (TMB < 1,0 mg/mL), Solução de Ácido Cítrico < 5% e Peróxido de Ureia < 1 %.
- 6- Solução de Parada** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução de Ácido Sulfúrico 1N.
- 7- Controle Negativo** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Soro negativo para Babesia Canina, com conservante. **Potencialmente infectante.**
- 8- Controle Positivo** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Soro positivo para Babesia Canina, com conservante. **Potencialmente infectante.**
- 9- Seladores de Placa**

APRESENTAÇÃO

Componentes	Apresentação		
	1	2	5
	96 cavidades	192 cavidades	480 cavidades
1- Placa Sensibilizada	1 unidade 96 cavidades	2 unidades 192 cavidades	5 unidades 480 cavidades
2- Conjugado Concentrado	1 x 300 µL	2 x 300 µL	5 x 300 µL
3- Lavagem Concentrada	1 x 50 mL	2 x 50 mL	5 x 50 mL
4- Diluente	1 x 60 mL	2 x 60 mL	5 x 60 mL
5- Substrato TMB	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL
6- Solução de Parada	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL
7- Controle Negativo	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL
8- Controle Positivo	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL
9- Seladores de Placa	3 unidades	6 unidades	15 unidades

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no quadro anterior.
- Instruções de uso (manual).

Materiais necessários, não contidos no Kit:

- 1- Pipetas capazes de dispensar volumes de 5 e 100 µL, com precisão maior que 1,5%.
- 2- Repipetadores para pipetagens repetitivas de volumes de 100µL e 300µL, com precisão maior que 1,5% (opcional) ou pipeta multicanal.
- 3- Lavadora de microplaca (opcional).
- 4- Leitora de ELISA com capacidade de absorvância em 450 nm e 630 nm de comprimento de onda.
- 5- Papel absorvente para secar as microcavidades.
- 6- Cronômetro ou relógio.
- 7- Frasco para estocar a Solução de lavagem após diluída.
- 8- Água destilada ou deionizada.
- 9- Ferramentas de Controle de Qualidade.
- 10- Incubadora com capacidade de 37°C ± 2°C.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8°C. O transporte pode ser feito em temperatura ambiente (até 30°C) por até 5 dias. Manter ao abrigo de luz e evitar umidade. **Não congelar.**

CUIDADOS ESPECIAIS

- 1- Produto de uso profissional.
- 2- Produto para diagnóstico *in vitro* de uso veterinário somente.

- 3- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.
- 4- O profissional deve seguir com rigor as normas e rotinas de segurança ao manipular amostras biológicas. O uso de luvas descartáveis e outros equipamentos de proteção individual é imprescindível.
- 5- **IMPORTANTE:** Antes de iniciar o ensaio, permita que todos os componentes do kit alcancem a temperatura ambiente. Abrir o envelope contendo as microcavidades somente após alcançar a temperatura ambiente.
- 6- Não misture reagentes de kits ou lotes diferentes. Não utilize componentes do kit vencidos.
- 7- Não coma, beba ou fume no local de realização do ensaio.
- 8- Não pipete reagentes ou amostra (s) utilizando a boca. Não utilize a mesma ponteira para pipetar diferentes amostras.
- 9- Os controles positivo e negativo devem ser retestados para cada novo ensaio realizado.
- 10- A Solução de Parada contém Ácido Sulfúrico, que é um ácido forte. Portanto, manuseá-lo com o devido cuidado.
- 11- Manusear os componentes do kit com o devido cuidado, a fim de evitar sua contaminação. Tome cuidado especial com o Substrato, que é uma solução sensível a luz. Utilize ponteiras e recipientes novos ou adequadamente limpos para seu manuseio e não permita sua exposição a luz forte durante sua estocagem ou nos períodos de incubação do ensaio.
- 12- Utilizar água recém destilada ou deionizada e isenta de contaminantes no preparo de soluções.
- 13- Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.
- 14- Antes de realizar a leitura da placa, assegurar que o fundo das microcavidades estejam limpos e secos. Garantir que não haja bolhas na superfície do líquido.
- 15- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.
- 16- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) disponibilizadas no site www.bioclin.com.br ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.
- 17- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.
- 18- Os instrumentos e equipamentos utilizados no ensaio devem estar devidamente calibrados e com as manutenções periódicas em dia.

AMOSTRAS

Utilizar soro ou plasma.

Amostras hemolisadas não devem ser usadas.

As amostras podem ser conservadas sob refrigeração, entre 2 e 8°C, pelo período máximo de 5 dias. Se as amostras não puderem ser analisadas dentro de 5 dias, podem ser estocadas por até 30 dias a temperatura de -20°C (freezer).

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO E AMOSTRAS

1- Solução de Lavagem

Diluir o conteúdo do frasco N°3 (Lavagem Concentrada) em 1000 mL de água recentemente destilada ou deionizada. Conservar entre 2 e 8°C até a data de validade impressa no frasco original. Pode ser armazenada em temperatura ambiente. Caso ocorra cristalização, aquecer a 37°C até dissolução.

2- Solução de Conjugado

Diluir o conjugado concentrado (frasco N°2) na proporção de 1/100 em Diluente (frasco N°4). Prepare a solução no momento de realizar o ensaio. Para realizar um ensaio utilizando todas as microcavidades do kit, misture 110 µL do conjugado concentrado em 10,9 mL de diluente. Para realizar um ensaio utilizando 8 microcavidades (1 tira), misture 10 µL do conjugado concentrado em 990 µL de diluente.

IMPORTANTE: A solução de conjugado diluída não pode ser estocada. Por isso, prepare apenas a quantidade necessária para realizar o ensaio.

3- Diluição das Amostras e Controles

Em um tubo de ensaio, diluir 5 µL da Amostra, Controle Negativo (frasco N° 7) e Controle Positivo (frasco N°8) em 400 µL de Diluente (frasco N°4). Tampar o tubo e agitar em vórtex gentilmente ou homogeneizar manualmente por inversão. As diluições não podem ser armazenadas.

TÉCNICA

Antes de iniciar o ensaio, permitir que todos os reagentes, amostras, microcavidades e controles alcancem a temperatura ambiente (15 - 30°C) por no mínimo 1 hora. Recomendamos fazer o ensaio utilizando duplicata de amostras e dos controles.

- 1- Adicionar 100 µL das Amostras, Controle Negativo e Controle Positivo **previamente diluídos**, nas microcavidades. Recomenda-se testar Amostras e Controles em duplicata. Opcionalmente pode-se separar uma microcavidade para o Branco.
- 2- Selar a placa, homogeneizar gentilmente e incubar a **37°C por 1 hora**.
- 3- Descartar o conteúdo das microcavidades por aspiração (lavadora) ou por decantação (manual). Usar aproximadamente 300µL por microcavidade de Solução de Lavagem **previamente diluída**, para um total de cinco (5) ciclos de lavagem. Agitar por 3 segundos em cada lavagem. Para a garantia da secagem da placa, ao final da lavagem, bater a placa por alguns segundos em papel absorvente.

IMPORTANTE: Lavagem/secagem deficiente pode causar resultados inadequados.

- 4- Pipetar 100 µL do Conjugado, **previamente diluído** em cada microcavidade.
- 5- Selar a placa, homogeneizar gentilmente e incubar a **37°C por 1 hora**.
- 6- Repetir o item 3.
- 7- Pipetar 100 µL de Substrato TMB em cada microcavidade.
- 8- Selar a placa, homogeneizar e incubar por **10 minutos a 37°C** e ao abrigo da luz.
- 9- Pipetar 100 µL de Solução de Parada em cada microcavidade. Homogeneizar suavemente.
- 10- Leia a absorvância de cada microcavidade em leitor de ELISA, em filtro duplo nos comprimentos de onda 450/630 nm em até 5 minutos após adição da Solução de Parada.

VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

Verifique se os resultados obtidos para leitura dos Controles e do Branco estão compatíveis com a especificação abaixo:

ITEM	ABSORBÂNCIA (FILTRO DUPLO)
Branco	< 0,050
Controle Negativo	0,100 a 0,300
Controle Positivo	> 0,800

Caso os valores se encontrem fora dos valores esperados, deve-se repetir o ensaio.

CÁLCULO DO CUT OFF

Se os resultados dos controles forem válidos, calcule o Cut Off com a seguinte fórmula:

$$\text{Cut Off} = \text{Absorbância média do Controle Negativo} + 0,200$$

CÁLCULO DO ÍNDICE DAS AMOSTRAS

Calcular o índice, dividindo a absorbância da amostra pelo valor de Cut Off. Exemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Amostra	0,992
Controle Negativo	0,210
Valor de Cut Off	$0,210 + 0,200 = 0,410$
Índice: Abs. da Amostra / valor de Cut Off	$0,992 / 0,410 = 2,42$

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS - QUALITATIVO

As amostras são consideradas positivas se o valor do índice for superior a 1,1. Serão consideradas negativas se o valor do índice for inferior a 0,9. Serão consideradas indeterminadas se o valor do índice for maior que 0,9 e menor que 1,1.

ITEM	ABSORBÂNCIA
Negativo	< 0,9
Positivo	> 1,1
Indeterminado	$\geq 0,9$ e $\leq 1,1$

IMPORTANTE: Amostras com resultado indeterminado devem ser retestadas. Amostras que apresentem resultados indeterminados repetidamente devem ser testadas por método alternativo. Caso esta amostra apresente resultado positivo, então deve ser considerada como positiva.

DESEMPENHO DO PRODUTO

Precisão

REPETIBILIDADE

A repetibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com valores diferentes, obtendo-se os seguintes resultados de absorbância:

REPETIBILIDADE	ABSORBÂNCIA		
	1	2	3
Média	0,780	0,980	0,090
Desvio Padrão	0,037	0,077	0,002
Coefficiente de Variação (%)	4,730	7,800	2,604

REPRODUTIBILIDADE

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas durante 3 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com valores diferentes, obtendo-se os seguintes resultados de absorbância:

REPRODUTIBILIDADE	ABSORBÂNCIA		
	1	2	3
Média	0,780	1,000	0,093
Desvio Padrão	0,050	0,049	0,005
Coefficiente de Variação (%)	6,414	4,879	5,072

Sensibilidade e Especificidade Clínica

O kit VETLISA BABESIA IgG analisou amostras clínicas em comparação com outro método de EIA. Os resultados mostram que o kit VETLISA BABESIA IgG apresenta sensibilidade clínica de 97,4% e especificidade clínica de 97,8%.

Método	Referência		Total	
	Negativo	Positivo		
VETLISA Babesia IgG	Negativo	88	1	89
	Positivo	2	37	39
Resultado Total		90	38	128

Sensibilidade Clínica: 97,4% (37/38)
Especificidade Clínica: 97,8% (88/90)
Precisão: 97,7% [(88 + 37) / (90 + 38)]

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

A interpretação de um teste diagnóstico, não deve ser estabelecida com base em um único ensaio. Devem-se incluir outros testes de confirmação, antes que uma amostra seja considerada positiva. Um resultado negativo não exclui a possibilidade de exposição. Enfim, todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com histórico de vacinação, informações clínicas e laboratoriais disponíveis.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

O Laboratório Clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, onde procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente estabelecidos. É importante ressaltar que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica característica, que deve ser monitorada pelos próprios laboratórios. Para tanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das medições.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

GARANTIA DE QUALIDADE

Antes de serem liberados para o consumo, todos os reagentes produzidos pela **Quibasa Química Básica Ltda** são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 – Santa Branca
CEP 31.565 -130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel.: (31) 3439.5454 - Fax (31) 3439.5455
E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

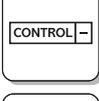
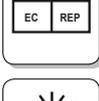
Serviço de Assessoria ao Cliente
Tel.: 0800 0315454
E-mail: sac@bioclin.com.br

Produto Licenciado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento desde 10/04/2019 sob o número 10.235/2019.

Responsável Técnico: Dr. Hugo Vieira Fróes (CRMV/MG 8963)

Revisão: Julho/2019

SIMBOLOGIA UNIVERSAL

	NÚMERO DE CATÁLOGO		FABRICADO POR
	NÚMERO DO LOTE		CONTROLE
	DATA DE FABRICAÇÃO		CONTROLE POSITIVO
	DATA DE VALIDADE (último dia do mês)		CONTROLE NEGATIVO
	LIMITE DE TEMPERATURA (conservar a)		RISCO BIOLÓGICO
	O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTES		INFLÂMVEL
	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CORROSIVO
	PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	REPRESENTANTE EUROPEU AUTORIZADO		MARCA CE
	PROTEGER DA LUZ E CALOR		NÃO UTILIZAR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA