

VETLISA LEISHMANIOSE IgG

REF VET043

INSTRUÇÕES DE USO USO VETERINÁRIO

FINALIDADE

Teste para determinação qualitativa de anticorpos contra Leishmania em soro ou plasma canino, por ensaio imunoenzimático, em microplaca. Somente para diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou ensaio imunoenzimático. Este produto é um ensaio imunoenzimático em fase sólida, baseado no princípio de imunocaptura para a detecção qualitativa de anticorpos IgG contra Leishmania em soro ou plasma de cães. Anticorpos contra Leishmania presentes na amostra, se ligam ao antígeno recombinante de promastigota de *L. infantum*, que reveste a microplaca, formando complexos imobilizados antígeno - anticorpos. 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. Em seguida, 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 Leishmania presente 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.

REAGENTES

- 1- Placa Sensibilizada** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Placa de poliestireno, dividida em 12 tiras de 8 poços cada, impregnada com antígeno recombinante de *L. infantum*.
- 2- Conjugado Concentrado (100X)** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução de anticorpo anti-IgG de cão ligado a Peroxidase.
- 3- Lavagem Concentrada (20X)** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução tamponada, surfactante e conservante.
- 4- Diluente** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução tamponada, 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 Uréia < 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 leishmaniose canina e conservante.
- 8- Controle Positivo** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Soro positivo para leishmaniose canina e conservante.
- 9 - Seladores de Placa**

APRESENTAÇÃO

Componentes	Apresentação		
	1	2	3
	96 cavidades	192 cavidades	480 cavidades
1- Placa Sensibilizada	1 unidade (96 cavidades)	2 unidades (2 x 96 cavidades)	5 unidades (5 x 96 cavidades)
2- Conjugado Concentrado (100X)	1 x 350 µL	2 x 350 µL	5 x 350 µL
3- Lavagem Concentrada (20X)	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 1,0 mL	2 x 1,0 mL	5 x 1,0 mL
8- Controle Positivo	1 x 1,0 mL	2 x 1,0 mL	5 x 1,0 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- Jogo de pipetas calibradas, capazes de dispensar volumes entre 5 e 1000 µL, com coeficiente de variação menor que 1,5%.
- 2- Repipetador ou pipeta multicanal calibrada para volume de 100 µL, com coeficiente de variação menor que 1,5% (opcional).
- 3- Lavadora de microplaca (opcional).
- 4- Leitora de ELISA com capacidade de absorvância em 450 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.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

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

CUIDADOS ESPECIAIS

- 1- Produto de uso profissional.
- 2- Somente para uso veterinário, para diagnóstico *in vitro*.
- 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 cavidades 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 ponteiros 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- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

AMOSTRAS

Utilizar soro ou plasma (EDTA ou heparina). 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, estocar por até 30 dias a -20°C (freezer).

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

ATENÇÃO: Os Controles Positivo e Negativo são pontos para o uso.

PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO E AMOSTRAS

1- Solução de Lavagem

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

2- Solução de Conjugado

Diluir o Conjugado Concentrado (Reagente N° 2) na proporção de 1/100 em Diluente (Reagente N°4). Prepare a solução no momento de realizar o ensaio. Para realizar um ensaio utilizando todas as cavidades do kit, misture 110 µL do Conjugado Concentrado em 11 mL de Diluente. Para realizar um ensaio utilizando 8 cavidades (1 tira), misture 10 µL do Conjugado Concentrado em 1 mL 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

Diluir as amostras na proporção de 1/20 em Diluente (Reagente N°4). Em um tubo de ensaio, diluir 15µL da amostra em 300µL de Diluente, se for realizar o ensaio em duplicata. 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, colocar todos os reagentes, Controles e Amostras para estabilizarem em temperatura ambiente (15 - 30°C) por no mínimo 30 minutos. Retornar as tiras não utilizadas para a embalagem original selada.

- 1- Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Controles e Amostras (podendo ser testados em duplicata).
- 2- Separar a primeira cavidade para o Branco (OPCIONAL).
- 3- Pipetar 100 µL do Controle Negativo e do Controle Positivo nas cavidades previamente determinadas. **Obs: Os controles estão prontos para o uso, não sendo necessário diluí-los.**
- 4- Pipetar 100 µL das Amostras previamente diluídas nas cavidades previamente determinadas. Na cavidade Branco (OPCIONAL), caso tenha feito a opção, pipetar somente 100 µL do diluente.
- 5- Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cobrir as cavidades com selador de placa.
- 6- Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 7- Descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (lavadora) ou por decantação (manual). Usar 300µL/cavidade aproximadamente de Solução de Lavagem previamente diluída, para um total de três (3) ciclos de lavagem. Agitar por três segundos em cada lavagem. Para a garantia da secagem da placa, ao final da lavagem, bater a placa por alguns segundos em papel absorvente.
- 8- **Nota:** Lavagem/secagem deficiente pode causar resultados inadequados.
- 8- Pipetar 100 µL de Conjugado previamente diluído em cada cavidade, inclusive na cavidade do Branco.
- 9- Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cobrir as cavidades com selador de placa.
- 10- Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 11- Repetir o item 7.
- 12- Adicionar 100 µL de Substrato TMB em cada microcavidade.
- 13- Homogeneizar gentilmente durante ± 3 segundos. Cobrir as cavidades com selador de placa.
- 14- Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente, protegido da luz.
- 15- Retirar o selador de placas das microcavidades.
- 16- Pipetar 100 µL de Solução de Parada em cada microcavidade.
- 17- Homogeneizar gentilmente durante ± 3 segundos.
- 18- Leia a absorvância em leitora de ELISA em filtro duplo de 450nm (filtro primário) / 630nm (filtro secundário) em até no máximo 10 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	< 0,450
Controle Positivo	> 1,000

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:

$$\text{Cut Off} = \text{Absorbância média do Controle Negativo} + 0,500$$

CÁLCULO DO ÍNDICE DAS AMOSTRAS

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

ITEM	ABSORBÂNCIA
Amostra	1,093
Controle Negativo	0,201
Valor de Cut Off	$0,201 + 0,500 = 0,701$
Índice: Abs. da Amostra / Valor de Cut Off	$1,093 / 0,701 = 1,559$

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS - QUALITATIVO

RESULTADOS	ÍNDICE
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.

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 permitam avaliar a precisão e a exatidão das medições.

DESEMPENHO DO PRODUTO

REPETIBILIDADE

A repetibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com valores diferentes. Foram obtidos os seguintes resultados:

REPETIBILIDADE	AMOSTRA		
	1	2	3
Média	1,794	1,029	0,040
Desvio Padrão	0,053	0,035	0,003
Coefficiente de Variação (%)	2,977	3,370	7,764

REPRODUTIBILIDADE

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas durante 3 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com valores diferentes. Foram obtidos os seguintes resultados:

REPRODUTIBILIDADE	AMOSTRA		
	1	2	3
Média	1,807	1,026	0,040
Desvio Padrão	0,050	0,035	0,003
Coefficiente de Variação (%)	2,760	3,422	6,895

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

O VETLISA LEISHMANIOSE IgG analisou amostras clínicas em comparação com outros métodos de EnzimaImunoensaio. Os resultados mostram que a sensibilidade clínica do kit é > 99,9% e a especificidade clínica é de 96%.

Método		Referência		Total
VETLISA LEISHMANIOSE IgG	Resultado	Negativo	Positivo	
	Negativo	144	0	144
	Positivo	6	150	156
Resultado Total		150	150	300

Sensibilidade Clínica: > 99,9% (150 / 150)
Especificidade Clínica: 96% (144 / 150)
Precisão: 98,0% [(144 + 150) / (150 + 150)]

REAÇÃO CRUZADA

Este produto foi testado com amostras de soro provenientes de animais diagnosticados como negativos para leishmaniose canina e positivos para as seguintes doenças: erliquiose, babesiose, leptospirose, anaplasmoose, cinomose, parvovirose e infecção por *Trypanosoma cruzi*. O produto apresentou resultado negativo em todas as condições testadas.

REAÇÃO COM CÃES VACINADOS

Este produto foi testado com amostras de soro provenientes de cães vacinados para leishmaniose, com vacina disponível no mercado. O produto apresentou resultado negativo para todas as amostras testadas.

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 02/08/2019 sob o número 10.264/2019.

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

Revisão: Agosto/2019

SIMBOLOGIA UNIVERSAL



NÚMERO DE CATÁLOGO



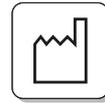
FABRICADO POR



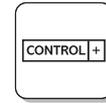
NÚMERO DO LOTE



CONTROLE



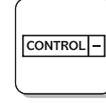
DATA DE FABRICAÇÃO



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



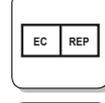
CORROSIVO



PRODUTO PARA
DIAGNÓSTICO IN VITRO



TÓXICO



REPRESENTANTE
EUROPEU AUTORIZADO



MARCA CE



PROTEGER DA
LUZ E CALOR



NÃO UTILIZAR SE A
EMBALAGEM ESTIVER
DANIFICADA