

VETLISA MORMO IgG

REF VET044

INSTRUÇÕES DE USO USO VETERINÁRIO

FINALIDADE

Teste para determinação qualitativa de anticorpos IgG anti-*Burkholderia mallei* no soro ou plasma de equinos, por ensaio imunoenzimático, em microplaca. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou ensaio imunoenzimático.

O VETLISA MORMO IgG é um ensaio imunoenzimático em fase sólida baseado no princípio de imunocaptura para a detecção qualitativa de anticorpos IgG contra a bactéria *Burkholderia mallei* em soro ou plasma de equinos.

Anticorpos contra a *Burkholderia mallei* presentes na amostra se ligam ao antígeno recombinante de *B. mallei* que reveste a microplaca, formando complexos imobilizados antígeno de *B. mallei*-anticorpos anti-*B. mallei*. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados. O Conjugado, constituído de anticorpo anti-IgG ligado a peroxidase se liga ao complexo antígeno-anticorpo imobilizado na placa. Após a segunda incubação, a microplaca é lavada, o Substrato TMB é adicionado e incubado. A intensidade da cor azul produzida pela adição do Substrato TMB é proporcional a quantidade de anticorpos anti-*B. mallei* presentes nas amostras. A Solução de Parada é adicionada para finalizar a reação, promovendo mudança de cor para amarelo, medida em um leitor de microplacas.

COMPONENTES DO KIT

- 1- Placa Sensibilizada** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Microplaca revestida com antígeno recombinante de *B. mallei*.
- 2- Conjugado Concentrado** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução de anticorpo anti-IgG de cavalo ligado à Peroxidase.
- 3- Lavagem Concentrada** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução tampão e conservante.
- 4- Diluente** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução tampão e conservante.
- 5- Substrato TMB** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Tampão contendo Tetrametilbenzidina (TMB) e conservante.
- 6- Solução de Parada** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Ácido Clorídrico.
- 7- Controle Negativo** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Soro Negativo para Mormo e conservante.
- 8- Controle Positivo** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Soro Positivo para Mormo e conservante.
- 9- Seladores de Placa**

APRESENTAÇÃO

Componentes	Apresentação		
	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 50mL	2 x 50mL	5 x 50mL
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, 100 e 500 µL, com coeficiente de variação menor que 1,5%.
- 2- Repipetadores para pipetagens repetitivas de volume de 100µL coeficiente de variação menor que 1,5% ou pipeta multicanal (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.
- 10- Incubadora com capacidade de 37°C ± 2°C.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A faixa de temperatura para armazenamento do produto é de 2 a 8°C. **Não congelar o produto.** O transporte pode ser feito em temperatura ambiente (até 30°C) por até 5 dias.

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 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 Clorídrico, 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- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.

17- 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

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

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- Diluição das Amostras

Em um tubo de ensaio, diluir 5µL da amostra em 500µL de Diluente (frasco N°4). Tampar o tubo e agitar em vórtex gentilmente ou homogeneizar manualmente por inversão. As diluições não podem ser armazenadas.

3- Diluição do Conjugado

Preparar somente a quantidade necessária para cada ensaio. Diluir o conteúdo do frasco N°2 (Conjugado Concentrado) na proporção de 1:50 com o Diluente (frasco N°4).

Para um teste de uma tira (8 cavidades), misture 20µL do Conjugado Concentrado em 1000µL de Diluente.

Para um teste de 96 cavidades (placa inteira), misture 220 µL do Conjugado Concentrado em 11mL de Diluente.

TÉCNICA

Antes de iniciar o ensaio, colocar todos os reagentes, Controles e Amostras para estabilizarem em temperatura ambiente (15 - 30°C) por no mínimo 40 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 1 hora a 37°C.

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 cinco (5) 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.

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 37°C.

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 37°C.
 15- Retirar o selador de placas das cavidades.
 16- Pipetar 100 µL de Solução de Parada em cada cavidade.
 17- Homogeneizar gentilmente durante ± 3 segundos.
 18- Leia a absorbância em leitora de ELISA em filtro duplo de 450nm/630nm em até no máximo 5 minutos após adição da Solução de Parada.

VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

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

ITEM	ABSORBÂNCIA MÉDIA
Branco	< 0,150
Controle Negativo	0,300 a 0,700
Controle Positivo	> 1,000

Caso os valores se encontrem fora dos valores esperados, deve-se repetir a técnica.

CÁLCULO DO CUT OFF

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

Cut Off = 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	1,803
Controle Negativo	0,530
Valor de Cut Off	0,530 + 0,500 = 1,030
Índice: Abs. da Amostra / valor de Cut Off	1,803 / 1,030 = 1,750

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS - QUALITATIVO

ITEM	ABSORBÂNCIA
Negativo	< 0,9
Indeterminado	≥ 0,9 e ≤ 1,1
Positivo	> 1,1

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	1,010	0,510	0,070
Desvio Padrão	0,041	0,040	0,005
Coefficiente de Variação (%)	4,085	7,894	7,294

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	1,025	0,523	0,068
Desvio Padrão	0,040	0,040	0,010
Coefficiente de Variação (%)	3,840	7,300	8,200

Sensibilidade e Especificidade Clínica

O kit VETLISA MORMO IgG analisou amostras clínicas em comparação com outro método de EIA. Os resultados mostram que o kit VETLISA MORMO IgG apresenta sensibilidade clínica de 90% e especificidade clínica de 90%.

Método	Referência		Total	
	Resultado	Positivo		Negativo
VETLISA MORMO IgG	Positivo	18	3	21
	Negativo	2	27	29
Resultado Total		20	30	50

Sensibilidade Clínica: 90% (18/20)
 Especificidade Clínica: 90% (27/30)
 Precisão: 90% [(18 + 27) / (20 + 30)]

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 outras 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 apresentem 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.

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 15/04/2019 sob o número 10.237/2019.

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