

VETLISA ERLQUIOSE IgG

REF VET040

INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE

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

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou imunoenzimático
Este produto é um ensaio imunoenzimático em fase sólida, baseado no princípio de imunocaptura para a detecção qualitativa de anticorpos IgG contra *Ehrlichia canis* em soro ou plasma de cães. Anticorpos contra *Ehrlichia canis* presentes na amostra se ligam ao antígeno recombinante de *Ehrlichia canis* 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 *Ehrlichia canis* 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 *E. canis*.
- 2- Conjugado Concentrado (100X)** - Armazenar entre 2 e 8 °C. Contém: Solução de anticorpo anti-IgG de cães 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 erliquiose canina e conservante. **Potencialmente infeccioso.**
- 8- Controle Positivo** - Armazenar entre 2 e 8 °C. Contém: Soro positivo para erliquiose canina e conservante. **Potencialmente infeccioso.**
- 9- Seladores de Placa**

APRESENTAÇÃO

Componentes	1	2	3
	96 cavidades	192 cavidades	480 cavidades
1- Placa Sensibilizada	1 unidade (96 cavidades)	2 unidades (192 cavidades)	5 unidades (480 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 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 item anterior.
- Instruções de uso (manual).

Materiais necessários não contidos no kit:

- 1- Pipetas capazes de dispensar volumes de 5 a 500 µL com coeficiente de variação menor que 1,5%.
- 2- Repipetador para pipetagens repetitivas de volumes de 500 µL com coeficiente de variação menor que 1,5% ou pipeta multicanal (opcional).
- 3- Lavadora de microplaca (opcional).
- 4- Leitora de ELISA com capacidade de absorbância 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 diluição.
- 8- Água destilada ou deionizada.
- 9- Ferramentas de Controle de Qualidade.
- 10- Incubadora de 37 °C ± 2 °C.

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- Somente para uso diagnóstico *in vitro* veterinário profissional.
- 2- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.
- 3- O sachê contendo a microplaca deve ser aberto somente após atingir a temperatura ambiente. Recolocar as tiras de microcavidades não utilizadas no sachê, vedar e conservar entre 2 e 8 °C.
- 4- A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de contaminantes.
- 5- Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, íons diversos, e agentes oxidantes e redutores que podem alterar de forma significativa os resultados.

6- A Solução de Parada contém Ácido Sulfúrico que é um ácido forte. Portanto, manuseá-lo com devido cuidado.

7- A manipulação de todo produto que contém soro é potencialmente capaz de transmitir doenças. Portanto, é preciso tomar os devidos cuidados de biossegurança na manipulação desses produtos.

8- Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.

9- Por medida de proteção, deve-se cobrir a placa durante a reação.

10- Deve-se assegurar que o fundo da cavidade esteja limpo e seco e que não haja bolhas na superfície do líquido antes de ler a placa. Não permitir que as cavidades sequem durante o ensaio.

11- Não exponha os reagentes, especialmente o Substrato, à luz forte ou vapores de Hipoclorito durante o armazenamento ou etapas de incubação.

12- 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.

13- 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.

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

15- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

AMOSTRAS

Soro ou Plasma (EDTA ou Heparina)

Amstras hemolisadas ou altamente lipêmicas 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.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

Estabilidade Após Aberto

Os resultados do teste de estabilidade comprovam que o kit VETLISA Erliquiose IgG é estável após aberto durante, pelo menos, 30 dias. Esta estabilidade pode variar de acordo com as condições do teste e do ambiente. Portanto, sugere-se acompanhar o desempenho do produto utilizando controles internos do kit e os critérios de validação da técnica.

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

Preparo dos Reagentes de Trabalho

SOLUÇÃO DE LAVAGEM

Diluir o conteúdo do frasco No 3 (Lavagem Concentrada) em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Após o preparo a solução pode ser estocada entre 2 a 30 °C durante, pelo menos, 30 dias. Pode ser armazenada em temperatura ambiente. Caso ocorra cristalização, aquecer a 37 °C até dissolução.

USO VETERINÁRIO

SUBSTRATO

O Substrato é pronto para o uso.

SOLUÇÃO DE CONJUGADO

Diluir o Conjugado Concentrado (Reagente Nº 2) na proporção de 1:101 em Diluente (Reagente Nº 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.

DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS

Em um tubo de ensaio, diluir 5 µL da amostra em 500 µL de Diluente (Reagente Nº 4), 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

Para uso em equipamentos automáticos, consulte o SAC (Serviço de Assessoria do Cliente)

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, 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 37 °C ± 2 °C.

7- Descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (lavadora) ou por decantação (manual). Usar 300 µL/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.

IMPORTANTE: 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 ± 2 °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 ± 2 °C, 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-** Ler a absorbância em leitora de ELISA em filtro duplo de 450 nm (filtro primário) / 630 nm (filtro secundário) em até no máximo 10 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 (FILTRO DUPLO)
Branco	< 0,100
Controle Negativo	0,050 a 0,250
Controle Positivo	> 1,000

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

Cálculos

Calcular o Cut Off de acordo com a seguinte fórmula:

Cut Off = Absorbância Média do Controle Negativo + 0,400

Exemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIA
	A1 = 0,151
Controle Negativo	A2 = 0,148
Cut Off = Absorbância Média do Controle Negativo + 0,400	(0,151 + 0,148) / 2 + 0,400 = 0,550

Calcular o Índice dividindo a absorbância da amostra pelo valor de Cut Off.

Exemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Amostra	1,236
Valor de Cut Off	0,550
Índice = Amostra / Valor de Cut Off	1,236 / 0,550 = 2,25

Nota: Os dados apresentados nos exemplos são apenas para ilustração e não podem ser usados para cálculo dos resultados.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Após o cálculo do índice das amostras, considerar os índices abaixo para a determinação dos resultados.

RESULTADOS	ÍNDICE
Negativo	< 0,9
Positivo	> 1,1
Indeterminado	≥ 0,9 e ≤ 1,1

Observação: No caso de resultado indeterminado, a amostra deve ser reanalisada. As amostras que obtiverem resultados repetidamente indeterminados devem ser retestadas utilizando um método alternativo. Se os resultados permanecem indeterminados, deve-se coletar uma nova amostra em duas semanas. Deve prevalecer o resultado da última amostra coletada.Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico veterinário responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

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

Precisão

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	0,550	1,320	0,080
Desvio Padrão	0,042	0,053	0,005
Coefficiente de Variação (%)	7,623	3,987	6,447

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	0,529	1,303	0,077
Desvio Padrão	0,047	0,063	0,004
Coefficiente de Variação (%)	8,937	4,848	5,715

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

O VETLISA ERLIQUIOSE IgG foi utilizado para analisar amostras clínicas em comparação com outro método de imunofluorescência indireta. Os resultados mostram que a sensibilidade clínica do kit é >99,9% e a especificidade clínica é de 97,3%.

MÉTODO		REFERÊNCIA		Total
VETLISA ERLIQUIOSE IgG	Resultado	Negativo	Positivo	
	Negativo	42	3	45
	Positivo	0	107	107
Total		42	110	152

Sensibilidade Clínica: >99,9% (42/42)

Especificidade Clínica: 97,3% (107/110)

Precisão: 98% [(107 + 42) / (110 + 42)]

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

A erliquiose é uma doença causada por bactérias do gênero *Ehrlichia*, que parasitam células sanguíneas como leucócitos, eritrócitos, células endoteliais e plaquetas. A transmissão ocorre pela picada do carrapato marrom (*Rhipicephalus sanguineus*) que se contamina com a bactéria após o repasto sanguíneo em cães com alta parasitemia. O período de incubação da erliquiose no cão varia entre 8 a 20 dias, e os sinais clínicos observados incluem petéquias na pele e mucosas, aumento dos linfonodos, hepatomegalia e esplenomegalia, apatia, perda de peso, inapetência, anorexia, febre, corrimento nasal e ocular. Quando o tratamento não resulta na eliminação total do organismo podem ocorrer recidivas posteriores. A resposta imunológica do cão contra a *Ehrlichia* é essencial para combater a infecção e também permite o diagnóstico pela detecção dos anticorpos em testes sorológicos.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1- COUTO CG. Doenças Rickettsiais In: BIRCHARD, SHERDING, Manual Saunders: Clínica de pequenos animais. Ed. Roca: 139-42, 1998

2- ETTINGER SJ, FELDMAN EC. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 4 ed. São Paulo: Editora Manole. 1992.

3- ROSEZ KV, ALVES FR, BLEICH I. Eriiquiose canina. Revista Cães & Gatos,n.96, p. 25-28. 2001.

4- WOLDEHIWET Z, RISTIC M. Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals, 1ed, Oxford, Pergamon Press, 1993, 427 p.

5- WOODY BJ, HOSKINS JD. Erlichial Diseases of dogs. Veterinary Clinics of North America:Small Animal Practice. n.1. v. 21, p.129-140. Janeiro 1991.

GARANTIA DE QUALIDADE

Antes de serem liberados para consumo, todos os reagentes Bioclin são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, 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

E-mail: bi°Clin@bi°Clin.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 06/09/2019 sob o número 10.269/2019.

Responsável Técnico: Dra. Camila Eckstein (CRMV/MG 20611)

Revisão: Novembro/2021

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> TESTE		INFLAMÁVEL
	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
	NÃO REUTILIZE		PRODUTO ESTERELIZADO
	CUIDADO		PERIGO

VETLISA EHRLICHIOSIS IgG

REF VET040

INSTRUCCIONES DE USO

FINALIDAD

Prueba para la determinación cualitativa de anticuerpos IgG contra *Ehrlichia canis* en suero o plasma de perro, mediante ensayo inmunoenzimático, en microplaca. Solo para diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE ACCIÓN

Metodología: Enzimainmunoensayo o inmunoenzimatico
Este producto es un inmunoensayo enzimático en fase sólida basado en el principio de inmunocaptura para la detección cualitativa de anticuerpos IgG contra *Ehrlichia canis* en suero o plasma de perro. Los anticuerpos contra *Ehrlichia canis* presentes en la muestra se unen al antígeno recombinante de *Ehrlichia canis* que recubre la microplaca, formando complejos antígeno-anticuerpo inmovilizados. Después de la incubación inicial, la microplaca se lava para eliminar los materiales no unidos. El conjugado, formado por un anticuerpo anti-IgG de perro unido a la peroxidasa, se une al complejo antígeno-anticuerpo inmovilizado en la placa. Luego, la microplaca se lava y se incuba con sustrato. La intensidad del color azul producido por la adición del sustrato es proporcional a la cantidad de anticuerpos contra *Ehrlichia canis* presentes en la muestra. Se agrega solución de parada para terminar la reacción, lo que provoca un cambio de color a amarillo medido en un lector de microplacas.

REACTIVOS

- 1- Placa Sensibilizada** - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Placa de poliestireno, dividida en 12 tiras de 8 pocillos cada una, impregnadas con antígeno recombinante de *E. canis*.
2- Conjugado Concentrado (100X) - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución de anticuerpos anti-IgG de perro ligados a peroxidasa.
3- Lavado Concentrado (20X) - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución tamponada, tensioactivo y conservante.
4- Diluyente - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución tamponada, tensioactivo, estabilizador y conservante.
5- Sustrato TMB - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución que contiene tetrametilbencidina (TMB <1.0 mg / mL), solución de ácido cítrico <5% y peróxido de urea <1%.
6- Solución de Parada - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: solución de ácido sulfúrico 1N.
7- Control Negativo - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Suero negativo para ehrlichiosis canina y conservante. **Potencialmente infeccioso.**
8- Control Positivo - Conservar entre 2 y 8 °C. Contiene: Suero positivo para ehrlichiosis canina y conservante. **Potencialmente infeccioso.**
9- Selladores de Placas

PRESENTACIÓN

Reactivos	1	2	3
	96 cavidades	192 cavidades	480 cavidades
1- Placa Sensibilizada	1 unidad (96 cavidades)	2 unidades (192 cavidades)	5 unidades (480 cavidades)
2- Conjugado Concentrado (100X)	1 x 350 µL	2 x 350 µL	5 x 350 µL
3- Lavado Concentrado (20X)	1 x 50 mL	2 x 50 mL	5 x 50 mL
4- Diluyente	1 x 60 mL	2 x 60 mL	5 x 60 mL
5- Sustrato TMB	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL
6- Solución de Parada	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL
7-Control Negativo	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL
8- Control Positivo	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL
9- Selladores de Placa	3 unidades	6 unidades	15 unidades

EQUIPOS Y INSUMOS OPERACIONALES

Materiales contenidos en el kit:

- Reactivos descritos en el cuadro anterior.
- Instrucciones de uso (manual).

Materiales necesarios, no contenidos en el kit:

- 1-** Pipetas capaces de dispensar volúmenes de 5 a 500 µL con un coeficiente de variación inferior al 1,5%.
2- Repetidor para pipeteo repetitivo de volúmenes de 500 µL con coeficiente de variación inferior al 1,5% o pipeta multicanal (opcional).
3- Lavadora de microplacas (opcional).
4- Lector de ELISA con capacidad de absorbancia a 450 y 630 nm de longitud de onda.
5- Papel absorbente para secar los pozos.
6- Cronómetro o reloj.
7- Frasco para almacenar la Solución de Lavado después de la dilución.
8- Agua destilada o desionizada.
9- Herramientas de control de calidad.
10- Incubadora a 37 °C ± 2 °C.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

La temperatura de almacenamiento do producto deberá ser de 2 a 8 °C. El transporte puede realizarse a temperatura ambiente até 30 °C por até 5 días. Mantener al abrigo de la luz y evitar la humedad. **No congelar.**

CUIDADOS ESPECIALES

- 1-** Solo para uso de diagnóstico *in vitro* veterinario profesional.
2- Seguir estrictamente la metodología propuesta para obtener resultados precisos.
3- El sobre que contiene la microplaca debe abrirse solo después de alcanzar la temperatura ambiente. Vuelva a colocar las tiras de los micropocillos no utilizados en el sobre, selle y almacene entre 2 y 8 °C.
4- El agua utilizada para limpiar el material debe ser fresca y libre de contaminantes.
5- Las columnas desionizadoras saturadas liberan agua alcalina, diferentes iones y agentes oxidantes y reductores que pueden alterar significativamente los resultados.

- 6-** La solución de parada contiene ácido sulfúrico, que es un ácido fuerte. Así que manipúlelo con el debido cuidado.
7- La manipulación de cualquier producto que contenga suero es potencialmente capaz de transmitir enfermedades. Por lo tanto, es necesario tomar las debidas precauciones de bioseguridad al manipular estos productos.
8- Pipetear los reactivos siempre en el mismo orden para minimizar la diferencia de tiempo de reacción entre los micropocillos.
9- Como medida de protección, la placa debe cubrirse durante la reacción.
10- Asegúrese de que el fondo de la cavidad esté limpio y seco y que no haya burbujas en la superficie del líquido antes de leer la placa. No permita que los pocillos se sequen durante el ensayo.
11- No exponga los reactivos, especialmente el sustrato, a luz fuerte o vapores de hipoclorito durante los pasos de almacenamiento o incubación.
12- Recomendamos aplicar la normativa local, estatal y federal de protección ambiental para que la eliminación de reactivos y material biológico se realice de acuerdo con la legislación vigente.
13- Para obtener información relacionada con la bioseguridad o en caso de accidentes con el producto, consulte la MSDS (Ficha de Información de Seguridad para Productos Químicos) disponible en el sitio web www.bioclin.com.br o a solicitud de la SAC (Servicio de Atención al Cliente) de Quibasa.
14- No utilice el producto en caso de daños en el embalaje.
15- Es fundamental que los instrumentos y equipos utilizados estén debidamente calibrados y sometidos a un mantenimiento periódico.

MUESTRAS

Suero o Plasma (EDTA o Heparina)

No se deben utilizar muestras hemolizadas o muy lipémicas. Las muestras pueden conservarse refrigeradas, entre 2 y 8 °C, durante un período máximo de 5 días. Si las muestras no se pueden analizar en 5 días, se pueden almacenar hasta 30 días a una temperatura de -20 °C.

DESCRIZACIÓN DEL PROCESO

Estabilidad Después de Abierto

Los resultados de la prueba de estabilidad muestran que el kit VETLISA Ehrlichiosis IgG es estable después de haber sido abierto durante al menos 30 días. Esta estabilidad puede variar según las condiciones de prueba y el entorno. Por lo tanto, se sugiere monitorear el desempeño del producto utilizando controles internos del kit y los criterios para validar la técnica.

ATENCIÓN: Los Controles Positivo y Negativo están listos para usar.

Preparación de Reactivos de Trabajo

SOLUCION DE LAVADO

Diluir el contenido del vial No. 3 (Lavado Concentrado) en 1000 mL de agua destilada o desionizada. Una vez preparada, la solución puede almacenarse entre 2 y 30 °C durante al menos 30 días. Puede conservarse a temperatura ambiente. Si se produce la cristalización, calentar a 37 °C hasta que se disuelva.

SUSTRATO

El sustrato está listo para su uso.

SOLUCIÓN DE CONJUGADO

Diluya el Conjugado Concentrado (Reactivo No. 2) en la proporción de 1:101 en Diluyente (Reactivo No. 4). Prepare la solución al realizar la prueba.
Para realizar un ensayo utilizando todos los pocillos del kit, mezcle 110 µL de Conjugado Concentrado en 11 mL de Diluyente. Para realizar un ensayo utilizando 8 pocillos (1 tira), mezcle 10 µL del Conjugado Concentrado en 1 mL de Diluyente.
IMPORTANTE: La solución de conjugado diluido no se puede almacenar. Por lo tanto, prepare solo la cantidad necesaria para realizar la prueba.

DILUCIÓN DE MUESTRAS

En un tubo de ensayo, diluya 5 µL de la muestra en 500 µL de Diluyente (Reactivo No. 4), si la prueba se va a realizar por duplicado. Tape el tubo y agite suavemente en vórtex o mezcle manualmente por inversión. Las diluciones no se pueden almacenar.

Técnica

Para uso en equipos automáticos, consultar al Servicio de Atención al Cliente (SAC)

- Antes de comenzar el ensayo, colocar todos los reactivos, Controles y Muestras para estabilizarse a temperatura ambiente (15 - 30 °C) durante al menos 30 minutos. Devuelva las tiras no utilizadas al embalaje original sellado.
1- Separar las cavidades a ser utilizadas considerando: Controles y Muestras (puede probar en duplicado).
2- Separar lo primero pocillo para el Blanco (OPCIONAL).
3- Pipetear 100 µL del Control Negativo e del Control Positivo en los pocillos previamente determinados. **Nota: Los controles estás listos para usar, no hay necesidad de diluirlos.**
4- Pipetear 100 µL de las muestras previamente diluidas en los pocillos previamente determinados. En la cavidad Blanco, si ha elegido, pipetear solo 100 µL del diluyente.
5- Homogeneizar suavemente durante ± 10 segundos. Cubrir las cavidades con sellador de placas.
6- Incubar por 30 minutos a 37 °C ± 2 °C.
7- Descartar el contenido de las cavidades por aspiración (lavadora) o por decantación (manual). Utilizar 300µL/pocillo aproximadamente de Solución de Lavado previamente diluida, para un total de cinco (5) ciclos de lavado. Agite durante tres segundos con cada lavado. Para la garantía del secado de la placa, al final del lavado, golpear la placa por unos segundos en papel absorbente.
IMPORTANTE: Lavado/secado deficiente puede causar resultados inadecuados.
8- Pipetear 100 µL de conjugado previamente diluido en cada pocillo, incluso en la cavidad del Blanco.
9- Homogeneizar suavemente durante ± 10 segundos. Cubrir las cavidades con el sellador de placa.
10- Incubar durante 30 minutos a 37 °C ± 2 °C.
11- Repetir el ítem 7.
12- Agregar 100 µL de Sustrato TMB a cada pocillo.
13- Homogeneizar suavemente durante ± 3 segundos. Cubrir las cavidades con el sellador de placa.
14- Incubar durante 10 minutos a 37 °C ± 2 °C, protegido de la luz.

- 15-** Retirar el sellador de placa de las cavidades.
- 16-** Pipetear 100 µL de Solución de Parada en todas las cavidades.
- 17-** Homogeneizar suavemente durante $\pm$ 3 segundos.
- 18-** Lea la absorbancia en un lector de ELISA en un filtro doble de 450 nm (filtro primario) / 630 nm (filtro secundario) dentro de un máximo de 10 minutos después de agregar la Solución de Parada.

VERIFICACIÓN DE LA TÉCNICA

Verifique que los resultados obtenidos para lectura los controles y el blanco sean compatibles con la especificación:

ITEM	ABSORBANCIA (FILTRO DUPLO)
Blanco	< 0,100
Control Negativo	0,050 a 0,250
Control Positivo	> 1,000

Si los valores están fuera de los valores esperados, la prueba debe repetirse.

Cálculos

Calcule el Cut-Off de acuerdo con la siguiente fórmula:

Cut-Off = Absorbancia de Control Negativo Promedio + 0,400

Ejemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
	A1 = 0,151
Control Negativo	A2 = 0,148
Cut Off = Absorbancia de Control Negativo Promedio + 0,400	(0,151 + 0,148) / 2 + 0,400 = 0,550

Calcule el índice dividiendo la absorbancia de la muestra por el valor de Cut-Off.

Ejemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Muestra	1,236
Valor de Cut Off	0,550
Índice = Muestra / Valor de Cut Off	1,236 / 0,550 = 2,25

Nota: Los datos presentados en los ejemplos son solo ilustrativos y no se pueden utilizar para calcular los resultados.

INTERPRETACIÓN DEL RESULTADO

Después de calcular el índice de la muestra, considere los índices siguientes para determinar los resultados.

RESULTADOS	ÍNDICE
Negativo	< 0,9
Positivo	> 1,1
Indeterminado	$\geq 0,9$ e $\leq 1,1$

Nota: En caso de un resultado indeterminado, la muestra debe volver a analizarse. Las muestras que obtienen resultados indeterminados repetidamente deben volver a analizarse utilizando un método alternativo. Si los resultados siguen siendo indeterminados, se debe recolectar una nueva muestra dentro de las dos semanas. Debe prevalecer el resultado de la última muestra recolectada, los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el veterinario responsable, y no es el único criterio para determinar el diagnóstico y / o tratamiento del paciente.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La interpretación de una prueba de diagnóstico no debe basarse en una sola prueba. Se deben incluir otras pruebas de confirmación antes de que una muestra se considere positiva. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición. Por último, todos los resultados deben interpretarse junto con el historial de vacunación y la información clínica y de laboratorio disponible.

CONTROL INTERNO DE CALIDAD

El Laboratorio Clínico debe contar con un programa de control de calidad interno, donde se establezcan claramente los procedimientos, normas, límites y tolerancia a variaciones. Es importante enfatizar que todos los sistemas de medición tienen una variabilidad analítica característica, la cual debe ser monitoreada por los propios laboratorios. Para eso, se recomienda el uso de controles, que permitan evaluar la precisión y exactitud de las medidas.

DESEMPEÑO DEL PRODUCTO

Precisión

REPETIBILIDAD

La repetibilidad fue calculada a partir de 10 determinaciones sucesivas, utilizando 3 muestras con valores diferentes, obteniéndose los siguientes resultados:

REPETIBILIDAD	MUESTRA		
	1	2	3
Promedio	0,550	1,320	0,080
Desvio Patrón	0,042	0,053	0,005
Coefficiente de Variación (%)	7,623	3,987	6,447

REPRODUCTIBILIDAD

La reproducibilidad se calculó a partir de 10 determinaciones sucesivas durante 3 días consecutivos utilizando 3 muestras con diferentes valores. Los siguientes resultados fueron obtenidos:

REPRODUTIBILIDAD	MUESTRA		
	1	2	3
Promedio	0,529	1,303	0,077
Desvio Patrón	0,047	0,063	0,004
Coefficiente de Variación (%)	8,937	4,848	5,715

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICA

El VETLISA EHRlichIOSIS IgG analizó muestras clínicas en comparación con otro método de inmunofluorescencia indirecta. Los resultados muestran que la sensibilidad clínica del kit es del >99,9% y la especificidad clínica es 97,3%.

MÉTODO		REFERÊNCIA		Total
VETLISA EHRlichIOSIS IgG	Resultado	Negativo	Positivo	
	Negativo	42	3	45
	Positivo	0	107	107
Total		42	110	152

Sensibilidad clínica: >99,9% (42/42)

Especificidad clínica: 97,3% (107/110)

Precisión: 98% [(107 + 42) / (110 + 42)]

SIGNIFICADO CLÍNICO

La ehrlichiosis es una enfermedad causada por bacterias del género *Ehrlichia*, que parasitan células sanguíneas como leucocitos, eritrocitos, células endoteliales y plaquetas. La transmisión se produce a través de la picadura de la garrapata marrón (*Rhipicephalus sanguineus*) que se contamina con la bacteria después de la ingestión de sangre en perros con alta parasitemia. El período de incubación de la ehrlichiosis en perros varía entre 8 y 20 días, y los signos cínicos observados incluyen petequias en la piel y membranas mucosas, agrandamiento de los ganglios linfáticos, hepatomegalia y esplenomegalia, apatía, pérdida de peso, inapetencia, anorexia, fiebre, secreción nasal y ojo. Cuando el tratamiento no da como resultado la eliminación total del cuerpo, pueden ocurrir más recaídas. La respuesta inmune del perro frente a *Ehrlichia* es fundamental para combatir la infección y también permite el diagnóstico mediante la detección de anticuerpos en pruebas serológicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- COUTO CG. Doenças Rickettsiais In: BIRCHARD, SHERDING, Manual Saunders: Clínica de pequenos animais. Ed. Roca: 139-42, 1998
- 2- ETTINGER SJ, FELDMAN EC. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 4 ed. São Paulo: Editora Manole. 1992.
- 3- ROSEZ KV, ALVES FR, BLEICH I. Erliquiose canina. Revista Cães & Gatos, n.96, p. 25-28. 2001.
- 4- WOLDEHIWET Z, RISTIC M. Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals, 1ed, Oxford, Pergamon Press, 1993, 427 p.
- 5- WOODY BJ, HOSKINS JD. Erlichial Diseases of dogs. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. n.1. v. 21, p.129-140. Janeiro 1991.

GARANTÍA DE CALIDAD

Antes de su liberación para el consumo, todos los reactivos de Bioclin son analizados por el Departamento de Control de Calidad. La calidad de los reactivos está asegurada hasta la fecha de caducidad mencionada en el empaque de presentación, siempre y cuando sean almacenados y transportados en las condiciones adecuadas.

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel.: (31) 3439.5454
E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Industria Brasileira

ATENDIMIENTO AO CONSUMIDOR

Servicio de Atendimento al Cliente
Tel.: 0800 0315454
E-mail: sac@bioclin.com.br

Producto con licencia en el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento desde el 06/09/2019 con el número 10.269/2019.

Responsable técnico: Dra. Camila Eckstein (CRMV/MG 20611)

Revisión: Noviembre/2021

SIMBOLOGÍA UNIVERSAL



NUMERO DE CATALOGO



FABRICADO POR



NUMERO DE LOTE



CONTROLAR



FECHA DE FABRICACIÓN



CONTROL POSITIVO



FECHA DE VALIDEZ
(último día del mes)



CONTROL NEGATIVO



LÍMITE DE TEMPERATURA
(tienda)



RIESGO BIOLÓGICO



EL CONTENIDO ES SUFICIENTE
PARA <N> PRUEBA



INFLAMABLE



VER INSTRUCCIONES
DE USO



CORROSIVO



PRODUCTO DE DIAGNÓSTICO
IN VITRO



TÓXICO



PROTEGER DE
LUZ Y CALOR



NO UTILICE SI EL
EMBALAJE ESTÁ
DAÑADO



NO REUTILIZA



PRODUCTO
ESTERILIZADO



PRECAUCIÓN



PELIGRO

VETLISA EHRLICHIOSIS IgG

REF VET040

USAGE INSTRUCTIONS

FUNCTION

Test for qualitative determination of IgG antibodies against *Ehrlichia canis* in dog serum or plasma, by immunoenzymatic assay, in microplate. For *in vitro* diagnostics only.

PRINCIPLE OF ACTION

Methodology: Enzyme immunoassay or immunoenzymatic.
This product is a solid-phase enzyme immunoassay based on the immunocapture principle for the qualitative detection of IgG antibodies against *Ehrlichia canis* in dog serum or plasma. Antibodies against *Ehrlichia canis* present in the sample bind to the recombinant *Ehrlichia canis* antigen that coats the microplate, forming immobilized antigen-antibody complexes. After the initial incubation, the microplate is washed to remove unbound materials. The conjugate, formed by anti-dog IgG antibody linked to peroxidase, binds to the antigen-antibody complex immobilized on the plate. Then the microplate is washed and incubated with Substrate. The intensity of the blue color produced by the addition of the Substrate is proportional to the amount of antibodies against *Ehrlichia canis* present in the sample. Stopping Solution is added to terminate the reaction, causing a color change to yellow as measured on a microplate reader.

REAGENTS

- 1- Sensitized Plate** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Polystyrene plate, divided into 12 strips of 8 wells each, impregnated with *E. canis* recombinant antigen.
- 2- Concentrated Conjugate (100X)** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Peroxidase-linked anti-dog IgG antibody solution.
- 3- Concentrated Wash (20X)** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Buffered solution, surfactant and preservative.
- 4- Diluent** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Buffered solution, surfactant, stabilizer and preservative.
- 5- Substrate TMB** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Solution containing tetramethylbenzidine (TMB <1.0 mg/mL), citric acid solution <5% and urea peroxide <1%.
- 6- Stop Solution** - Store between 2 and 8 °C. Contains: 1N sulfuric acid solution.
- 7- Negative Control** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Negative serum for canine ehrlichiosis and preservative. **Potentially infectious.**
- 8- Positive Control** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Positive serum for canine ehrlichiosis and preservative. **Potentially infectious.**
- 9- Plate Sealers**

PRESENTATIONS

Reagents	1	2	3
	96 Cavities	192 Cavities	480 Cavities
1- Sensitized Plate	1 Unit (96 cavities)	2 Units (192 cavities)	5 Units (480 cavities)
2- Concentrated Conjugate (100x)	1 x 350 µL	2 x 350 µL	5 x 350 µL
3- Concentrated Wash (20x)	1 x 50 mL	2 x 50 mL	5 x 50 mL
4- Diluent	1 x 60 mL	2 x 60 mL	5 x 60 mL
5- Substrate TMB	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL
6- Stop Solution	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL
7- Negative Control	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL
8- Positive Control	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL
9- Plate Sealers	3 Units	6 Units	15 Units

EQUIPMENT AND OPERATIONAL INPUTS

Materials contained in the kit:
- Reagents described in the previous table.
- Instructions for use (manual).

Necessary materials not contained in the kit:

- 1-** Pipettes capable of dispensing volumes of 5 to 500 µL with a variation coefficient of less than 1.5%.
- 2-** Repipettor for repetitive pipetting of volumes of 500 µL with coefficient of variation less than 1.5% or multichannel pipette (optional).
- 3-** Microplate washer (optional).
- 4-** ELISA reader with absorbance capacity at 450 and 630 nm wavelength.
- 5-** Absorbent paper to dry the wells.
- 6-** Stopwatch or watch.
- 7-** Bottle to store the Washing Solution after dilution.
- 8-** Distilled or deionized water.
- 9-** Quality Control Tools.
- 10-** Incubator at 37 °C ± 2 °C.

TRANSPORTATION AND STORAGE CONDITIONS

The product storage temperature should be 2 to 8 °C. Transport can be carried out at room temperature 30 °C for up to 5 days. Keep away from light and avoid humidity. **Do not freeze.**

SPECIAL CARE

- 1-** For professional veterinary *in vitro* diagnostic use only.
- 2-** Strictly follow the proposed methodology to obtain accurate results.
- 3-** The sachet containing the microplate must be opened only after reaching room temperature. Replace strips from unused microwells in the sachet, seal and store at 2 to 8 °C.
- 4-** The water used to clean the material must be fresh and free of contaminants.
- 5-** Saturated deionizer columns release alkaline water, different ions, and oxidizing and reducing agents that can significantly alter the results.
- 6-** The Stop Solution contains Sulfuric Acid which is a strong acid. So handle it with due care.

- 7-** The handling of any product that contains serum is potentially capable of transmitting diseases. Therefore, it is necessary to take proper biosafety precautions when handling these products.
- 8-** Pipette the reagents always in the same order to minimize the difference in reaction time between the microwells.
- 9-** For protection measure, the plate must be covered during the reaction.
- 10-** Ensure that the bottom of the cavity is clean and dry and that there are no bubbles on the surface of the liquid before reading the plate. Do not allow wells to dry during the assay.
- 11-** Do not expose reagents, especially Substrate, to strong light or Hypochlorite vapors during storage or incubation steps.
- 12-** We recommend applying local, state and federal regulations for environmental protection so that the disposal of reagents and biological material is done in accordance with current legislation.
- 13-** To obtain information related to biosafety or in case of accidents with the product, consult the MSDS (Safety Information Sheet for Chemical Products) available on the website www.bioclin.com.br or upon request by the SAC (Service of Customer Service) by Quibasa.
- 14-** Do not use the product in case of damage to the packaging.
- 15-** It is essential that the instruments and equipment used are properly calibrated and subjected to periodic maintenance.

SAMPLES

Serum or Plasma (EDTA or Heparin)
Hemolyzed or highly lipemic samples should not be used. The samples can be kept refrigerated, between 2 and 8 °C, for a maximum period of 5 days. If the samples cannot be analyzed within 5 days, they can be stored for up to 30 days at a temperature of -20 °C.

PROCESS DESCRIPTION

Stability After Open
The results of the stability test show that the VETLISA Ehrlichiosis IgG kit is stable after being opened for at least 30 days. This stability may vary according to the test conditions and the environment. Therefore, it is suggested to monitor the performance of the product using internal controls of the kit and the criteria for validating the technique.

ATTENTION: The Positive and Negative Controls are ready to use.

Preparation of Works Reagents

WASHING SOLUTION
Dilute the contents of vial No. 3 (Concentrated Washing Solution) in 1000 mL of distilled or deionized water. After preparation, the solution can be stored at 2 to 30 °C for at least 30 days. It can be stored at room temperature. If crystallization occurs, heat to 37 °C until dissolved.

SUBSTRATE

The Substrate is ready for use.

CONJUGATE SOLUTION

Dilute the Concentrated Conjugate (Reagent No. 2) in the ratio of 1:101 in Diluent (Reagent No. 4). Prepare the solution at the moment of performing the test.

VETERINARY USE

To perform an assay using all cavities in the kit, mix 110 µL of Concentrated Conjugate in 11 mL of Diluent.
To perform an assay using 8 cavities (1 strip), mix 10 µL of the Concentrated Conjugate in 1 mL of Diluent.
IMPORTANT: The diluted conjugate solution cannot be stored. Therefore, prepare only the amount necessary to perform the test.

SAMPLE DILUTION

In a test tube, dilute 5 µL of the sample in 500 µL of Diluent (Reagent No. 4), if performing the assay in duplicate. Cap tube and vortex gently or mix manually by inversion. Dilutions cannot be stored.

TECHNIQUE

For use in automatic equipment, consult the Customer Service Department (SAC)
Before starting the assay, place all reagents, Controls and Samples to stabilize at room temperature (15 - 30 °C) for at least 30 minutes. Return the unused strips to the original sealed packaging.
1- Select the cavities to be used considering: Controls and Samples (it is recommended to test in duplicate).
2- Select the first cavity for the Blank (OPTIONAL).
3- Pipette 100 µL of the Negative Control and the Positive Control into the previously determined cavities. **Note: The controls are ready to use, there is no need to dilute them.**
4- Pipette 100 µL of the previously diluted samples into the previously determined cavities. In the Blank cavity, if you have chosen, pipette only 100 µL of the diluent.
5- Homogenize gently for ± 10 seconds. Cover the cavities with plate sealer.
6- Incubate for 30 minutes at 37 °C ± 2 °C.
7- Discard the content of the cavities by aspiration (washing machine) or by decantation (manual). Use approximately 300 µL/ cavity of previously diluted Wash Solution, for a total of five (5) wash cycles. Shake for three seconds after each wash cycle. To guarantee the drying of the plate, at the end of the wash, tap the plate for a few seconds on absorbent paper.
IMPORTANT: Poor washing/drying can cause inadequate results.
8- Pipette 100 µL of the Conjugate previously diluted into each cavity, even in the Blank cavity.
9- Homogenize gently for ± 10 seconds. Cover the cavities with plate sealer.
10- Incubate for 30 minutes at a 37 °C ± 2 °C.
11- Repeat item 7.
12- Add 100 µL of Substrate TMB into each cavity.
13- Homogenize gently for ± 3 seconds. Cover the cavities with plate sealer.
14- Incubate for 10 minutes at a 37 °C ± 2 °C, protected from light.
15- Remove the plate sealer from the cavities.
16- Pipette 100 µL of Stop Solution into all cavities.
17- Homogenize gently for ± 3 seconds
18- Read the absorbance in an ELISA reader on a dual filter 450 nm (primary filter) / 630nm (secondary filter) within a maximum of 10 minutes after adding the Stop Solution.

TECHNIQUE VERIFICATION

Check if the results obtained for reading the Blank and the Controls are compatible with the values presented below:

ITEM	ABSORBANCE (DUAL FILTER)
Blank	< 0.100
Negative Control	0.050 to 0.250
Positive Control	> 1.000

If the values are outside the expected values, the technique should be repeated.

Calculations

Calculate Cut Off according to the following formula:

Cut Off = Average Negative Control Absorbance + 0.400

Example:

ITEM	ABSORBANCE
	A1 = 0.151
Negative Control	A2 = 0.148
Cut Off = Average Negative Control Absorbance + 0,400	$(0.151 + 0.148) / 2 + 0.400 = 0.550$

Calculate the Index by dividing the Sample's absorbance by the Cut Off value.

Example:

ITEM	ABSORBANCIA
Sample	1.236
Cut Off Value	0.550
Índice = Samples / Cut Off Value	$1.236 / 0.550 = 2.25$

Note: The data presented in the examples are for illustration only and cannot be used to calculate the results.

INTERPRETATION OF THE RESULT

After calculating the sample index, consider the indices below to determine the results.

RESULTS	ÍNDICE
Negative	< 0.9
Positive	> 1.1
Undetermined	Between 0.9 e ≤ 1.1

Note: In case of an indeterminate result, the sample must be reanalyzed. Samples that repeatedly obtain indeterminate results should be retested using an alternative method. If results remain indeterminate, a new sample should be collected within two weeks. The result of the last sample collected must prevail. The results provided by this kit must be interpreted by the responsible veterinarian, and is not the only criterion for determining the diagnosis and/or treatment of the patient.

PROCESS LIMITATIONS

The interpretation of a diagnostic test should not be established on the basis of a single test. Other confirmation tests must be included before a sample is considered positive. A negative result does not exclude the possibility of exposure. Finally, all results should be interpreted together with vaccination history, clinical and laboratory information available.

INTERNAL QUALITY CONTROL

The Clinical Laboratory must have an internal quality control program, where procedures, norms, limits and tolerance for variations are clearly established. It is important to emphasize that all measurement systems have a characteristic analytical variability, which must be monitored by the laboratories themselves. For that, it is recommended the use of controls, which allow evaluating the precision and accuracy of the measurements.

PRODUCT PERFORMANCE

Accuracy

REPEATABILITY

Repeatability was calculated from 10 successive determinations using 3 samples with different values. The following results were obtained:

REPEATABILITY	Sample		
	1	2	3
Mean	0.550	1.320	0.080
Standard Deviation	0.042	0.053	0.005
Coefficient of Variation (%)	7.623	3.987	6.447

REPRODUTIBILITY

Reproducibility was calculated from 10 successive determinations over 3 consecutive days using 3 samples with different values. The following results were obtained:

REPEATABILITY	Sample		
	1	2	3
Mean	0.529	1.303	0.077
Standard Deviation	0.047	0.063	0.004
Coefficient of Variation (%)	8.937	4.848	5.715

CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

The VETLISA EHRlichiosis IgG was used to analyze clinical samples in comparison with another method of indirect immunofluorescence. The results show that the clinical sensitivity of the kit is >99.9% and the clinical specificity is 97.3%.

METHOD		REFERENCE		Total
VETLISA EHRlichiosis IgG	Result	Negative	Positive	
	Negative	42	3	45
	Positive	0	107	107
Total		42	110	152

Clinical Sensitivity: >99.9% (42/42)

Clinical Specificity: 97.3% (107/110)

Accuracy: 98% $[(107 + 42) / (110 + 42)]$

CLINICAL SIGNIFICANCE

Ehrlichiosis is a disease caused by bacteria of the *Ehrlichia* genus, which parasitize blood cells such as leukocytes, erythrocytes, endothelial cells and platelets. Transmission occurs through the bite of the brown tick (*Rhipicephalus sanguineus*) that becomes contaminated with the bacteria after the blood meal in dogs with high parasitemia. The incubation period for ehrlichiosis in dogs varies between 8 to 20 days, and the cynical signs observed include petechiae in the skin and mucous membranes, lymph node enlargement, hepatomegaly and splenomegaly, apathy, weight loss, inappetence, anorexia, fever, runny nose and eye. When treatment does not result in total elimination from the body, further relapses may occur. The dog's immune response against *Ehrlichia* is essential to fight the infection and also allows for diagnosis by detecting antibodies in serological tests.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- 1- COUTO CG. Doenças Rickettsiais In: BIRCHARD, SHERDING, Manual Saunders: Clínica de pequenos animais. Ed. Roca: 139-42, 1998
- 2- ETtinger SJ, FElDman EC. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 4 ed. São Paulo: Editora Manole. 1992.
- 3- ROSEZ KV, ALVES FR, BLEICH I. Erliquiose canina. Revista Cães & Gatos, n.96, p. 25-28. 2001.
- 4- WOLDEHIWET Z, RISTIC M. Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals, 1ed, Oxford, Pergamon Press, 1993, 427 p.
- 5- WOODY BJ, HOSKINS JD. Erlichial Diseases of dogs. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. n.1. v. 21, p.129-140. Janeiro 1991.

QUALITY ASSURANCE

Before being released for consumption, all Bioclin reagents are tested by the Quality Control Department. The quality of the reagents is ensured until the expiration date mentioned on the presentation packaging, as long as they are stored and transported under the appropriate conditions.



QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes. 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel.: (31) 3439.5454

E-mail: bioclin@bioclin.com.br

CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Industria Brasileira

CONSUMER SERVICE

Customer Support Service

Tel.: 0800 0315454

E-mail: sac@bioclin.com.br

Product licensed in the Ministry of Agriculture. Livestock and Supply since 06/09/2019 with the number 10.269/2019.

Technical manager: Dra. Camila Eckstein (CRMV/MG 20611)

Review: November/2021

UNIVERSAL SYMBOLOGY

	CATALOG NUMBER		MADE BY
	LOT NUMBER		CONTROL
	MANUFACTURING DATE		POSITIVE CONTROL
	VALIDITY DATE (last day of the month)		NEGATIVE CONTROL
	TEMPERATURE LIMIT (store)		BIOLOGICAL RISK
	CONTENT IS SUFFICIENT FOR «>» TEST		FLAMMABLE
	SEE INSTRUCTIONS FOR USE		CORROSIVE
	IN VITRO DIAGNOSTIC PRODUCT		TOXIC
	EUROPEAN AUTHORIZED REPRESENTATIVE		CE MARK
	KEEP AWAY FROM SUNLIGHT		DO NOT USE IF PACKAGE IS DAMAGED
	DO NOT REUSE		PRODUCT STERILIZED
	CAUTION		DANGER