

VETLISA LEISHMANIOSE FELINA IgG

REF VET047

INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE

Teste para determinação qualitativa de anticorpos IgG contra *Leishmania infantum* em soro ou plasma de felino, 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 *Leishmania infantum* em soro ou plasma de felinos. Anticorpos contra *L. infantum* 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 felino 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 felino 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 1M.
- 7- Controle Negativo** - Armazenar entre 2 e 8 °C. **Potencialmente infeccioso.**
- 8- Controle Positivo** - Armazenar entre 2 e 8 °C. **Potencialmente infeccioso.**
- 9 - Seladores de Placa**

APRESENTAÇÃO

Componentes	Apresentação			
	1	2	3	4
	96 cavidades	192 cavidades	480 cavidades	960 cavidades
1- Placa Sensibilizada	1 unidade (96 cavidades)	2 unidades (192 cavidades)	5 unidades (480 cavidades)	10 unidades (960 cavidades)
2- Conjugado Concentrado (100X)	1 x 300 µL	1 x 350 µL	1 x 650 µL	1 x 1300 µL
3- Lavagem Concentrada (20X)	1 x 50 mL	2 x 50 mL	4 x 50 mL	6 x 50 mL
4- Diluente	1 x 60 mL	2 x 60 mL	5 x 60 mL	10 x 60 mL
5- Substrato TMB	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL	10 x 15 mL
6- Solução de Parada	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL	10 x 15 mL
7-Controle Negativo	1 x 1 mL	1 x 2 mL	1 x 4 mL	1 x 6 mL
8- Controle Positivo	1 x 1 mL	1 x 2 mL	1 x 4 mL	1 x 6 mL
9-Seladores de Placa	3 unidades	6 unidades	15 unidades	30 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 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* 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 Clorídrico 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)

Amostras 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 Leishmaniose Felina 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.

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 Nº4). 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 15 µL da amostra em 300 µL 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

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 (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 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.
- 8- Incubar por 30 minutos a 37 °C ± 2 °C.
- 9- Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cobrir as cavidades com selador de placa.
- 10- Repetir o item 7.
- 11- Adicionar 100 µL de Substrato TMB em cada microcavidade.
- 13- Homogeneizar gentilmente durante ± 3 segundos. Cobrir as cavidades com selador de placa.

USO VETERINÁRIO

- 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- Leia 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 o ensaio.

Cálculos

Calcular o Cut Off de acordo com a seguinte fórmula:

Cut Off = Absorbância Média do Controle Negativo + 0,350.

Exemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Controle Negativo	A1 = 0,107
	A2 = 0,112
Cut Off = Absorbância Média do Controle Negativo + 0,350	(0,107 + 0,112) / 2 + 0,350 = 0,459

Calcular o Índice dividindo a absorbância da Amostra pelo valor de Cut Off. Exemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Amostra	1,093
Valor de Cut Off	0,459
Índice = Amostra / Valor de Cut Off	1,093 / 0,459 = 2,381

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	Entre 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. Todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas disponíveis, antes do diagnóstico descritivo da doença.

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 dosagens.

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	AMOSTRA		
	1	2	3
Média	0,311	1,028	1,713
Desvio Padrão	0,034	0,103	0,172
Coefficiente de Variação (%)	10,95	10,01	10,02

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	AMOSTRA		
	1	2	3
Média	0,303	1,057	1,681
Desvio Padrão	0,031	0,082	0,146
Coefficiente de Variação (%)	10,16	7,76	8,66

Sensibilidade e Especificidade Clínica

O VETLISA LEISHMANIOSE FELINA 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 97,6% e a especificidade clínica é de >99%.

MÉTODO		REFERÊNCIA		Total
VETLISA LEISHMANIOSE FELINA IgG	Resultado	Negativo	Positivo	
	Negativo	132	1	
	Positivo	0	40	
Resultado Total		132	41	173

Sensibilidade Clínica: 97,6% (40/41)
Especificidade Clínica: >99% (132/132)
Precisão: 99,4% [(132+40) / (132+41)]

SIGNIFICADO CLÍNICO

A Leishmaniose é uma doença infecciosa e zoonótica causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, que parasita células do sistema fagocítico. A transmissão ocorre através da picada do vetor *Lutzomyia longipalpis*, também conhecido popularmente como mosquito-palha. O número crescente de casos de leishmaniose felina tem chamado a atenção para o papel dos felinos na epidemiologia da doença. O período de incubação da leishmaniose é longo, com média de 3 a 7 meses, mas podendo variar entre 3 meses a vários anos. As principais manifestações clínicas são linfadenopatia generalizada, dermatite esfoliativa, emagrecimento progressivo e ceratoconjuntivite. Nos gatos, os animais apresentam-se comumente assintomáticos e a medula óssea é um importante reservatório do parasita. Com frequência, os sinais clínicos são confundidos com esporotricose e o diagnóstico diferencial deve ser feito.O diagnóstico sorológico pela detecção de anticorpos é uma ferramenta eficaz e segura. Além disso, o diagnóstico da leishmaniose é essencial para o controle dos reservatórios e evitar a transmissão para o ser humano.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. KILLICK-KENDRICK R, KILLICK-KENDRICK M, PINELLI E, DEL REAL G, MOLINA R, VITUTIA MM, CANAVATE MC, NIETO J. A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with Leishmania infantum promastigotes from midguts of ex- perimentally infected phlebotomine sandflies. Parasite, 1994, 7, 311-318.
2. RIBEIRO VM. Leishmanioses. In: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais; DE NARDI AB, ROZA MR, organizadores. PROMOVET Pequenos Animais: Programa de Atualização em Medicina Veterinária: Ciclo 1. Porto Alegre: Artmed Panamericana; 2016.p.107- 50.(Sistema de Educação Continuada a Distância; v.3. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1ª ed. Brasília- DF,2006.
3. COSTA TAC, ROSSI CN, LAURENTI MD, GOMES AAD, VIDES JP, SOBRINHO LSV, MARCONDES M. Ocorrerencia de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo, v.47, n.3, p.213-217, 2010.
4. QUIBASA: Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

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: 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 03/09/2020 sob o número 10.353/2020.

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

Revisão: Setembro/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 LEISHMANIASIS FELINA IgG

REF VET047

INSTRUCCIONES DE USO

FINALIDAD

Prueba para la determinación cualitativa de anticuerpos IgG contra *Leishmania infantum* en suero o plasma de felino, por ensayo inmunoenzimático, en microplaca. Solamente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE ACCIÓN

Metodología: Enzimainmunoensayo o inmunoenzimático Este producto es un ensayo inmunoenzimático en fase sólida, basado en el principio de inmunocaptura para la detección cualitativa de anticuerpos IgG contra *Leishmania infantum* en suero o plasma de felinos. Los anticuerpos contra *L. infantum* presentes en la muestra, se unen al antígeno recombinante de promastigote de *L. infantum*, 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 el anticuerpo anti-IgG de felino 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 Leishmania presentes en la muestra. La solución de parada se agrega para finalizar la reacción, promoviendo un cambio de color a amarillo, medido en un lector de microplacas.

REAGENTES 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 *L. infantum*.
2- Conjugado Concentrado (100x) - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución de anticuerpo anti-IgG de felino ligado a Peroxidasa.
3- Lavado Concentrado (20x) - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución Tamponada, surfactante y conservante.
4- Diluyente - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución Tamponada, surfactante, estabilizante y conservante.
5- Sustrato TMB - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución que contiene Tetrametilbenzidina (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: Ácido Sulfúrico 1M.
7- Control Negativo - Almacenar entre 2 y 8 °C. **Potencialmente infeccioso.**
8- Control Positivo - Almacenar entre 2 y 8 °C. **Potencialmente infeccioso.**
9- Selladores de Placa

PRESENTACIONES

Componentes	Apresentação			
	1	2	3	4
	96 pocillos	192 pocillos	480 pocillos	960 pocillos
1- Placa Sensibilizada	1 unidade (96 pocillos)	2 unidades (192 pocillos)	5 unidades (480 pocillos)	10 unidades (960 pocillos)
2- Conjugado Concentrado (100X)	1 x 300 µL	1 x 350 µL	1 x 650 µL	1 x 1300 µL
3- Lavado Concentrado (20X)	1 x 50 mL	2 x 50 mL	4 x 50 mL	6 x 50 mL
4- Diluyente	1 x 60 mL	2 x 60 mL	5 x 60 mL	10 x 60 mL
5- Sustrato TMB	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL	10 x 15 mL
6- Solución de Parada	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL	10 x 15 mL
7-Control Negativo	1 x 1 mL	1 x 2 mL	1 x 4 mL	1 x 6 mL
8- Control Positivo	1 x 1 mL	1 x 2 mL	1 x 4 mL	1 x 6 mL
9- Selladores de Placa	3 unidades	6 unidades	15 unidades	30 unidades

EQUIPAMIENTOS Y INSUMOS OPERACIONALES

Materiales contenidos en el kit:

- Reactivos descritos en el ítem 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- Solamente para el uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
2- Seguir estrictamente la metodología propuesta para obtener resultados exactos.
3- El sobre que contiene la microplaca debe abrirse solo después de alcanzar la temperatura ambiente. Vuelva a colocar las tiras de micropocillos no utilizadas en el sobre, ciérrelo y guárdelo entre 2 y 8 °C.
4- El agua utilizada para limpiar el material debe ser fresca y libre de contaminantes.
5- Las columnas desionizantes saturadas liberan agua alcalina, varios iones y agentes oxidantes y reductores que pueden alterar significativamente los resultados.
6- La solución de parada contiene ácido clorhídrico, que es un ácido fuerte. Por lo tanto, manipúlelo con el debido cuidado.
7- La manipulación de cualquier producto que contenga suero es potencialmente capaz de transmitir enfermedades. Por tanto, es necesario cuidar la bioseguridad en el manejo de estos productos.
8- Pipetear los reactivos siempre en el mismo orden para minimizar la diferencia en el tiempo de reacción entre los pocillos.
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 la prueba.
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 las normas de protección ambiental locales, estatales y federales 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, consultar la FISPQ (Ficha de Información de Seguridad de Productos Químicos) disponible en el sitio web www.bioclin.com.br o a solicitud del Cliente SAC (Servicio de Químicos) Servicio) 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.

DESCRICIÓN DEL PROCESO

Estabilidad Después de Abierto

Los resultados de la prueba de estabilidad muestran que el kit VETLISA Leishmaniasis Felina 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.

DILUICIÓN DE MUESTRAS

En un tubo de ensayo, diluya 15 µL de la muestra en 300 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 (OPCIONAL), 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 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 ± 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 Tecnica

Compruebe si los resultados obtenidos para la lectura del blanco y los controles son compatibles con los valores que se presentan abajo:

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

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

Cálculos

Calcule el Cut-Off de acuerdo con la siguiente fórmula:
Cut-Off = Absorbancia de Control Negativo Promedio + 0,350
Ejemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Control Negativo	A1 = 0,107
	A2 = 0,112
Cut Off = Absorbância de Controle Negativo Promédio + 0,350	(0,107 + 0,112) / 2 + 0,350 = 0,459

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

ITEM	ABSORBÂNCIA
Muestra	1,093
Valor de Cut Off	0,459
Índice = Muestra / Valor de Cut Off	1,093 / 0,459 = 2,381

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	≥ 0,9 e ≤ 1,1

Nota: En el 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 en dos semanas. Debe prevalecer el resultado de la última muestra recolectada, los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el profesional médico veterinario responsable, y no es el único criterio para determinar el diagnóstico y/o tratamiento del paciente.

LIMITACIONES DE PRUEBA

La interpretación de una prueba de diagnóstico no debe establecerse sobre la base de 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. Todos los resultados deben interpretarse junto con otra información clínica disponible, antes del diagnóstico descriptivo de la enfermedad.

CONTROL INTERNO DE CALIDAD

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

DESEMPEÑO DEL PRODUCTO

Precisión

REPETIBILIDAD

La repetibilidad se calculó a partir de 10 determinaciones sucesivas, utilizando 3 muestras con diferentes valores, obteniendo los siguientes resultados de absorbancia:

REPETIBILIDAD	Muestra		
	1	2	3
Media	0,311	1,028	1,713
Desviación estándar	0,034	0,103	0,172
Coefficiente de Variación (%)	10,95	10,01	10,02

REPRODUTIBILIDAD

La reproducibilidad se calculó a partir de 10 determinaciones sucesivas durante 3 días consecutivos, utilizando 3 muestras con diferentes valores, obteniendo los siguientes resultados de absorbancia:

REPRODUCTIBILIDAD	Muestra		
	1	2	3
Media	0,303	1,057	1,681
Desviación estándar	0,031	0,082	0,146
Coefficiente de Variación (%)	10,16	7,76	8,66

Sensibilidad e Especificidad Clínica

Se utilizó VETLISA LEISHMANIOSE FELINA IgG para analizar muestras clínicas en comparación con otro método de inmunofluorescencia indirecta. Los resultados muestran que la sensibilidad clínica del kit es del 97,6% y la especificidad clínica es> 99%.

METODO		REFERENCIA		Total
VETLISA EHRlichiosis IgG	Resultado	Negativo	Positivo	
	Negativo	132	1	133
	Positivo	0	40	40
Resultado Total		132	41	173

Sensibilidad clínica: 97,6% (40/41)
Especificidad clínica:> 99% (132/132)
Precisión: 99,4% [(132 + 40) / (132 + 41)]

SIGNIFICADO CLÍNICO

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa y zoonótica causada por el protozoo Leishmania infantum, que parasita las células del sistema fagocítico. La transmisión se produce a través de la picadura del vector Lutzomyia longipalpis, también conocido popularmente como mosquito de la paja. El creciente número de casos de leishmaniasis felina ha llamado la atención sobre el papel de los felinos en la epidemiología de la enfermedad. El período de incubación de la leishmaniasis es largo, con un promedio de 3 a 7 meses, pero puede variar de 3 meses a varios años. Las principales manifestaciones clínicas son linfadenopatía generalizada, dermatitis exfoliativa, pérdida de peso progresiva y queratoconjuntivitis. En los gatos, los animales suelen ser asintomáticos y la médula ósea es un reservorio importante del parásito. A menudo, los signos clínicos se confunden con la esporotricosis y se debe realizar el diagnóstico diferencial. El diagnóstico serológico por detección de anticuerpos es una herramienta eficaz y segura. Además, el diagnóstico de leishmaniasis es fundamental para controlar los reservorios y prevenir la transmisión a los humanos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KILLICK-KENDRICK R, KILLICK-KENDRICK M, PINELLI E, DEL REAL G, MOLINA R, VITUTIA MM, CANAVATE MC, NIETO J. A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with Leishmania infantum promastigotes from midguts of ex- perimentally infected phlebotomine sandflies. Parasite, 1994, 7, 311-318.
2. RIBEIRO VM. Leishmanioses. In: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais; DE NARDI AB, ROZA MR, organizadores.PROMOVET Pequenos Animais: Programa de Atualização em Medicina Veterinária: Ciclo 1. Porto Alegre: Artmed Panamericana; 2016.p.107- 50. (Sistema de Educação Continuada a Distância; v.3. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1ª ed. Brasília- DF, 2006.
3. COSTA TAC, ROSSI CN, LAURENTI MD, GOMES AAD, VIDES JP, SOBRINHO LSV, MARCONDES M. Ocorrerencia de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo, v.47, n.3, p.213-217, 2010.
4. QUIBASA: Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

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

ATENDIMENTO 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 03/09/2020 con el número 10.353/2020.

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

Revisión: Septiembre/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
	EUROPEA REPRESENTANTE AUTORIZADO		MARCADO CE
	PROTEGER DE LUZ Y CALOR		NO UTILICE SI EL EMBALAJE ESTA DAÑADA
	NO REUTILIZA		PRODUCTO ESTERILIZADO
	PRECAUCIÓN		PELIGRO

VETLISA FELINE LEISHMANIASIS IgG

REF VET047

USAGE INSTRUCTIONS

FUNCTION

Test for qualitative determination of IgG antibodies against *Leishmania infantum* using feline serum or plasma, by enzyme immunoassay, in microplate. For *in vitro* diagnostic use only.

PRINCIPLE OF ACTION

Methodology: Enzyme immunoassay or immunoenzymatic. This product is an immunoenzymatic assay in solid phase, based on the principle of immunocapture for the qualitative detection of IgG antibodies against *Leishmania infantum* in feline serum or plasma. Antibodies against *L. infantum* present in the sample, bind to the recombinant promastigote antigen of *L. infantum* coated on the microplate, forming immobilized antigen-antibody complexes. After the initial incubation, the microplate is washed to eliminate unbound materials. The Conjugate, formed by the anti-feline IgG antibody conjugated to peroxidase, binds the immobilized antigen-antibody complex 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 number of antibodies against *Leishmania* present in the sample. The Stop Solution is added to stop the reaction, promoting a color change to yellow, measured in a microplate reader.

REAGENTS

- 1- Sensitized Plate** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Polystyrene plate, divided into 12 strips of 8 cavities each, impregnated with recombinant *L. infantum* antigen.
- 2- Concentrated Conjugate (100x)** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Peroxidase-linked anti-feline IgG antibody solution.
- 3- Concentrated Wash Solution (20x)** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Buffer Solution, surfactant and preservative.
- 4- Diluent - Store between 2 and 8 °C. Contains:** Buffer solution, surfactant, stabilizer and preservative.
- 5- Substrate TMB** - Store between 2 and 8 °C. Contains: Solution containing Tetramethylbenzidine (TMB <1.0mg/mL), Citric Acid Solution <5% and Urea Peroxide <1%.
- 6- Stop Solution** - Store between 2 and 8°C. Contains: 1M Sulfuric Acid.
- 7- Negative Control** - Store between 2 and 8 °C. **Potentially infectious.**
- 8- Positive Control** - Store between 2 and 8 °C. **Potentially infectious.**
- 9- Plate Sealers**

PRESENTATIONS

Componentes	Apresentação			
	1	2	3	4
	96 wells	192 wells	480 wells	960 wells
1- Sensitized Plate	1 unidade (96 wells)	2 unidades (192 wells)	5 unidades (480 wells)	10 unidades (960 wells)
2- Concentrated Conjugate (100X)	1 x 300 µL	1 x 350 µL	1 x 650 µL	1 x 1300 µL
3- Concentrated Wash Solution (20X)	1 x 50 mL	2 x 50 mL	4 x 50 mL	6 x 50 mL
4- Diluent	1 x 60 mL	2 x 60 mL	5 x 60 mL	10 x 60 mL
5- Substrate TMB	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL	10 x 15 mL
6- Stop Solution	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL	10 x 15 mL
7- Negative Control	1 x 1 mL	1 x 2 mL	1 x 4 mL	1 x 6 mL
8- Positive Control	1 x 1 mL	1 x 2 mL	1 x 4 mL	1 x 6 mL
9- Plate Sealers	3 units	6 units	15 units	30 units

EQUIPMENT AND OPERATIONAL INPUTS

Materials contained in the kit:

- Reagents described in the previous item.
- Usage Instructions (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 *in vitro* diagnostic use only.
- 2-** Strictly follow the proposed methodology to obtain exact results.
- 3-** The sachet containing the microplate must be opened only after reaching room temperature. Replace the unused microwell strips in the sachet, seal and store at 2 to 8 °C.
- 4-** The water used to clean the material must be fresh and free from contaminants.
- 5-** Saturated deionizing columns release alkaline water, various ions, and oxidizing and reducing agents that can significantly alter the results.
- 6-** The Stop Solution contains Hydrochloric Acid which is a strong acid. Therefore, handle it with due care.
- 7-** The handling of any product that contains serum is potentially capable of transmitting disease. Therefore, it is necessary to take due care of biosafety in the handling of these products.
- 8-** Pipette the reagents always in the same order to minimize the difference in reaction time between the wells.
- 9-** As a protection measure, the plate must be covered during the reaction.
- 10-** Make sure that the bottom of the cavity is clean and dry and that there are no bubbles on the liquid surface before reading the plate. Do not allow the wells to dry out during the test.
- 11-** Do not expose the reagents, especially the Substrate, to strong light or Hypochlorite vapors during storage or incubation steps.
- 12-** We recommend applying local, state and federal environmental protection standards so that the disposal of reagents and biological material is carried out 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 Chemicals) Customer Service) of 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 Feline Leishmaniasis 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 Work 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. 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 15 µL of the sample in 300 µL of Diluent (Reagent No. 4), if the test is going to be performed in duplicate. Cap the tube and gently vortex or manually mix 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 (OPTIONAL), 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 minu tes 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.

VETERINARY USE

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 + 0.350

Example:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Negative Control	A1 = 0,107
	A2 = 0,112
Cut Off = Average Negative Control Absorbance 0.350	(0,107 + 0,112) / 2 + 0,350 = 0,459

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

Example:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Sample	1,093
Cut Off Value	0,459
Index = Samples / Cut Off Value	1,093 / 0,459 = 2,381

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

INTERPRETATION OF THE RESULTS

RESULTS	INDEX
Negative	< 0.9
Positive	> 1.1
Undetermined	Between 0,9 - 1,1

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

PROCEDURE LIMITATIONS

The interpretation of a diagnostic test should not be established on the basis of a single test. Other confirmatory tests must be included before a sample is considered positive. A negative result does not exclude the possibility of exposure. All results must be interpreted in conjunction with other available clinical information, before the descriptive diagnosis of the disease.

INTERNAL QUALITY CONTROL

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

PRODUCT PERFORMANCE

Accuracy
REPEATABILITY
Repeatability was calculated from 10 successive determinations, using 3 samples with different values, obtaining the following absorbance results:

REPEATABILITY	Sample		
	1	2	3
Mean	0.311	1.028	1.713
Standard Deviation	0.034	0.103	0.172
Coefficient of Variation (%)	10.95%	10.01%	10.02%

REPRODUTIBILITY
Reproducibility was calculated from 10 successive determinations over 3 consecutive days, using 3 samples with different values, obtaining the following absorbance results:

REPRODUCTIBILITY	Sample		
	1	2	3
Mean	0.303	1.057	1.681
Standard Deviation	0.031	0.082	0.146
Coefficient of Variation (%)	10.16	7.76	8.66

Clinical Sensitivity and Specificity
The VETLISA FELINE LEISHMANIASIS 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 97.6% and the clinical specificity is >99%.

METHOD		REFERENCE		Total
VETLISA EHRlichiosis IgG	Resultado	Negativo	Positivo	
	Negativo	132	1	133
	Positivo	0	40	40
Resultado Total		132	41	173

Clinical Sensitivity: 97.6% (40/41)
Clinical Specificity:> 99% (132/132)
Accuracy: 99.4% [(132 + 40) / (132 + 41)]

CLINICAL SIGNIFICANCE
Leishmaniasis is an infectious and zoonotic disease caused by the protozoan Leishmania infantum, which parasites cells of the phagocytic system. Transmission occurs through the bite of the vector Lutzomyia longipalpis, also popularly known as the straw mosquito. The increasing number of cases of feline leishmaniasis has drawn attention to the role of felines in the epidemiology of the disease. The incubation period for leishmaniasis is long, with an average of 3 to 7 months, but it can vary from 3 months to several years. The main clinical manifestations are generalized lymphadenopathy, exfoliative dermatitis, progressive weight loss and keratoconjunctivitis. In cats, animals are commonly asymptomatic and bone marrow is an important reservoir of the parasite. Often, clinical signs are mistaken for sporotrichosis and the differential diagnosis must be made. The serological diagnosis by the detection of antibodies is an effective and safe tool. In addition, the diagnosis of leishmaniasis is essential to control the reservoirs and prevent transmission to humans.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES
1. KILLICK-KENDRICK R, KILLICK-KENDRICK M, PINELLI E, DEL REAL G, MOLINA R, VITUTIA MM, CANAVATE MC, NIETO J. A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with Leishmania infantum promastigotes from midguts of ex- perimentally infected phlebotomine sandflies. Parasite, 1994, 7, 311-318.
2. RIBEIRO VM. Leishmanioses. In: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais; DE NARDI AB, ROZA MR, organizadores. PROMOVET Pequenos Animais: Programa de Atualização em Medicina Veterinária: Ciclo 1. Porto Alegre: Artmed Panamericana; 2016.p.107- 50. (Sistema de Educação Continuada a Distância; v.3. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1ª ed. Brasília- DF, 2006.
3. COSTA TAC, ROSSI CN, LAURENTI MD, GOMES AAD, VIDES JP, SOBRINHO LSV, MARCONDES M. Ocorerencia de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo, v.47, n.3, p.213-217, 2010.
4. QUIBASA: Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

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 03/09/2020 with the number 10.353/2020.

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

Review: September/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