

VETLISA ERLIQUIOSE IgM

REF
VET066

INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE

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

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou ensaio imunoenzimático. O VETLISA ERLiquiose IgM é um ensaio imunoenzimático em fase sólida, baseado no princípio de imunocaptura para a detecção qualitativa de anticorpos IgM contra *Ehrlichia canis* em soro ou plasma de cães. Anticorpos contra *Erlchia canis* presentes na amostra se ligam aos antígenos recombinantes de *E. canis* que revestem a microplaca, formando imunocomplexos antígeno-anticorpo imobilizados. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados. O Conjugado, formado por anticorpo anti-IgM de cão ligado à Peroxidase, é adicionado e se liga aos anticorpos IgM ligados aos antígenos imobilizados na placa. Após uma segunda incubação, a microplaca é lavada para remover os excedentes. Após esta etapa, o Substrato é adicionado e incubado, produzindo uma cor azul, cuja intensidade é proporcional a quantidade de anticorpos IgM contra *Ehrlichia canis* presente na amostra. A Solução de Parada é adicionada para interromper a reação, promovendo uma mudança de cor de azul 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 *Ehrlichia canis*.
- 2- Conjugado Concentrado (100X)** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Anticorpo anti-IgM de cão conjugado à peroxidase e estabilizante de proteína.
- 3- Lavagem Concentrada (20X)** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução tampão, surfactante e conservante.
- 4- Diluente** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução Tampão, estabilizantes, corante, surfactante e conservante.
- 5- Substrato TMB** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução contendo 3, 3', 5, 5' - Tetrametilbenzidina (TMB), Peróxido de Uréia e conservante.
- 6- Solução de Parada** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução de Ácido Sulfúrico 1 mol/L.
- 7- Controle Negativo** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Soro contendo soro negativo para anticorpos IgM contra *Ehrlichia canis* e estabilizante de proteína. **Potencialmente infectante.**
- 8- Controle Positivo** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém Soro contendo soro positivo para anticorpos IgM contra *Ehrlichia canis* e estabilizante de proteína. **Potencialmente infectante.**
- 9 - Seladores de Placa**

APRESENTAÇÃO

Componentes	Apresentação			
	1	2	3	4
	96 cavidades	192 cavidades	480 cavidades	960 cavidades
1- Placa Sensibilizada	1 unidade	2 unidades	5 unidades	10 unidades
2- Conjugado Concentrado (100X)	1 x 300 µL	2 x 300 µL	5 x 300 µL	10 x 300 µL
3- Lavagem Concentrada (20X)	1 x 50 mL	2 x 50 mL	5 x 50 mL	10 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	2 x 1 mL	5 x 1 mL	10 x 1 mL
8- Controle Positivo	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL	10 x 1 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 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).

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 ERLiquiose IgM é estável após aberto por até 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 da Lavagem Concentrada (Reagente Nº 3) em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Após o preparo, a solução pode ser estocada entre 2 a 30 °C por até 30 dias. Pode ser armazenada em temperatura ambiente. Caso ocorra cristalização, aquecer a 37°C até dissolução.

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.

Substrato

O Substrato é pronto para o uso.

TÉCNICA

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

Antes de iniciar o ensaio, colocar todos os reagentes, amostras e controles para estabilizarem em temperatura ambiente (15 – 30 °C) por no mínimo 40 minutos.

1- Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Controles e Amostras (recomenda-se testar em duplicata). Retornar as tiras não utilizadas da microplaca para a embalagem original selada.

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 placas.

6- Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37°C ± 2°C.

7- Retirar o selador das cavidades.

8- Descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (Lavadora) ou por decantação (Manual). Usar 300 µL aproximadamente de Solução de Lavagem, **previamente preparada**, e efetuar um total de cinco (5) ciclos de lavagem. Agitar por 3 segundos em cada lavagem. Para a garantia da secagem da placa, ao final da lavagem, bater a placa por alguns segundos em papel absorvente.

IMPORTANTE: Lavagem/secagem deficiente pode causar resultados inadequados.

9- Pipetar 100 µL de Conjugado previamente diluído em todas as cavidades.

10- Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.

11- Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37°C ± 2°C.

12- Retirar o selador de placa das cavidades.

13- Repetir o item 8.

14- Pipetar 100 µL de Substrato em todas as cavidades.

15- Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.

16- Incubar por 10 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37°C ± 2°C.

17- Retirar o selador de placa das cavidades.

18- Pipetar 100 µL de Solução de Parada em todas as cavidades.

19- Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos.

20- Ler utilizando filtro duplo: 450 nm / 630 nm em até 10 minutos (no máximo).

VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

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

ITEM	ABSORBÂNCIA (FILTRO DUPLO)
Branco	< 0,100
Controle Negativo	0,050 a 0,250
Controle Positivo	> 0,800

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 + 0,500

Exemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIA
	A1 = 0,153
Controle Negativo	A2 = 0,157
Cut Off = Absorbância Média do Controle Negativo + 0,500	(0,153 + 0,157) / 2 + 0,500 = 0,655

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

Exemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Amostra	1,680
Valor de Cut Off	0,655
Índice: Abs. da Amostra / Valor de Cut Off	1,680 / 0,655 = 2,34

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

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

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

RESULTADOS	QUALITATIVO
	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 permanecerem 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 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 definitivo da doença.

INTERFERENTES

Nenhuma interferência foi observada por Triglicérides 1500 mg/dL, Ácido Ascórbico 2 g/dL, Creatina 200 mg/dL, Bilirrubina 1 g/dL, Albumina 2 g/dL, Hemoglobina 1000 mg/dL, Ácido Oxálico 60 mg/dL, Fator Reumatóide 980 UI/mL, Proteína C Reativa 41,2 mg/dL e Anti-Estreptolisina O 1023 UI/mL.

REATIVIDADE CRUZADA

Um estudo de reatividade cruzada foi realizado, avaliando 35 amostras negativas para anticorpos IgM contra *Ehrlichia canis*, mas positivas para outras infecções. Foras testadas 6 amostras positivas para Brucelose, 5 amostras positivas para Cinomose, 1 amostra positiva para Parvovirose, 12 amostras positivas para Babesiose, 4 amostras positivas Dirofilariose, 4 amostras positivas para Leptospirose e 3 amostras positivas para Leishmaniose. Não foi observada reatividade cruzada com nenhuma das amostras. Apesar dos resultados encontrados, não se pode descartar completamente a possibilidade de reatividade cruzada. O diagnóstico final deve considerar os dados clínicos do paciente juntamente com outros dados laboratoriais.

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	ABSORBÂNCIA		
	1	2	3
Média	1,492	0,775	0,227
Desvio Padrão	0,077	0,012	0,007
Coefficiente de Variação (%)	5,18	1,51	3,28

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	ABSORBÂNCIA		
	1	2	3
Média	1,473	0,793	0,197
Desvio Padrão	0,077	0,020	0,032
Coefficiente de Variação (%)	5,26	2,46	16,31

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

No VETLISA Erliquiose IgM, foram analisadas amostras clínicas em comparação com outro método de Enzimaimunoensaio. Os resultados mostram que a sensibilidade clínica do kit é 97,8% e a especificidade clínica é de 96,4%.

VETLISA Erliquiose IgM	Método	Referência		Total
	Resultado	Positivo	Negativo	
		44	2	46
		1	53	54
	Resultado Total	45	55	100

Sensibilidade Clínica: 97,8% (44/45) - IC 95%: 91,5% - 100%

Especificidade Clínica: 96,4% (53/55) - IC 95%: 93,5% - 100%

Precisão: 97,0% (44+53) / (55+45)

SIGNIFICADO CLÍNICO

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. A Imunoglobulina M (IgM), é a primeira classe de anticorpos produzida pelo sistema imunológico, e a sua produção indica a ocorrência de infecção recente. Desta forma, a detecção de IgM favorece o diagnóstico precoce e favorece a instituição precoce do tratamento.

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. 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. Janeiro1991.

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

GARANTIA DE QUALIDADE

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



QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 – Santa Branca

CEP 31.565 -130 - Belo Horizonte - MG - Brasil

Tel.: 31 3439.5454 | 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 04/09/2022 sob o número 10.531/2022.

Responsável Técnico:

Dra. Camila Eckstein (CRMV/MG 20611)

Revisão: Outubro/2022

SIMBOLOGIA UNIVERSAL



NÚMERO DE CATALOGO



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



INFLÂMVEL



CONSULTAR INSTRUÇÕES
DE USO



CORROSIVO



PRODUTO PARA
DIAGNÓSTICO IN VITRO



TÓXICO



PROTEGER DA
LUZ E CALOR



NÃO UTILIZAR SE A
EMBALAGEM ESTIVER
DANIFICADA



NÃO REUTILIZE



PRODUTO
ESTERILIZADO



CUIDADO



PERIGO

VETLISA EHRLICHIOSIS IgM

REF
VET066

INSTRUCCIONES DE USO

FINALIDAD

Prueba para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM contra *Ehrlichia canis* en suero o plasma de perros, mediante ensayo inmunoenzimatico, en microplaca. Solamente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE ACCIÓN

Metodología: Enzimainmunoensayo o inmunoenzimatico
El VETLISA Ehrlichiosis IgM es un ensayo inmunoenzimatico en fase sólida, basado en el principio de inmunocaptura para la detección cualitativa de anticuerpos IgM contra *Ehrlichia canis* en suero o plasma de perros. Los anticuerpos contra *Ehrlichia canis* presentes en la muestra se unen a los antígenos recombinantes de *Ehrlichia canis* que recubren la microplaca, formando inmunocomplejos antígeno-anticuerpo inmovilizados. Después de la incubación inicial, la microplaca se lava para eliminar los materiales no unidos. El conjugado, formado por un anticuerpo IgM anti-perro ligado a la Peroxidasa, se agrega y se une a los anticuerpos IgM ligados a los antígenos inmovilizados en la placa. Después de una segunda incubación, la microplaca se lava para eliminar el exceso. Después de esta etapa, se agrega e incuba el Sustrato, produciendo un color azul, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de anticuerpos IgM contra *Ehrlichia canis* presentes en la muestra. La solución de parada se agrega para detener la reacción, promoviendo un cambio de color de azul a amarillo, medido en un lector de microplacas.

REACTIVOS

- 1- Placa Sensibilizada** - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Contiene: Placa de poliestireno, dividida en 12 tiras de 8 pocillos cada una, impregnadas con antígeno recombinante de *Ehrlichia canis*.
- 2- Conjugado Concentrado (100X)** - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Anticuerpo anti-IgM de perro conjugado a Peroxidasa y estabilizador de proteínas.
- 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, estabilizantes, colorante, surfactante y conservante.
- 5- Sustrato TMB** - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución contiendo 3, 3', 5, 5' - Tetrametilbenzidina (TMB), Peróxido de Urea y conservante.
- 6- Solución de Parada** - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución de Ácido Sulfúrico 1 mol/L.
- 7- Control Negativo** - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Suero contiendo suero negativo para anticuerpos IgM contra *Ehrlichia canis* y estabilizador de proteína. **Potencialmente infeccioso.**
- 8- Control Positivo** - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Suero contiendo suero positivo para anticuerpos IgM contra *Ehrlichia canis* y estabilizador de proteína. **Potencialmente infeccioso.**
- 9 - Selladores de Placa**

PRESENTACIÓN

Componentes	Presentación			
	1	2	3	4
	96 pocillos	192 pocillos	480 pocillos	960 pocillos
1- Placa Sensibilizada	1 unidad	2 unidades	5 unidades	10 unidades
2- Conjugado Concentrado (100x)	1 x 300 µL	2 x 300 µL	5 x 300 µL	10 x 300 µL
3- Lavado Concentrado (20x)	1 x 50 mL	2 x 50 mL	5 x 50 mL	10 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	2 x 1 mL	5 x 1 mL	10 x 1 mL
8- Control Positivo	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL	10 x 1 mL
9- Selladores de Placa	3 unidades	6 unidades	15 unidades	30 unidades

EQUIPAMIENTOS E 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-** Lectora 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 de 37 °C ± 2 °C.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

La temperatura de almacenamiento del producto es de 2 a 8 °C. El transporte se puede realizar a temperatura ambiente (hasta 30 °C) durante un máximo de 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.**
- Seguir estrictamente la metodología propuesta para obtener resultados precisos.
- 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.
- El agua utilizada para limpiar el material debe ser fresca y libre de contaminantes.
- 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 altamente lipémicas. Las muestras pueden mantenerse 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 -20°C.

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO Estabilidad Después de Abrir

Los resultados de la prueba de estabilidad muestran que el kit VETLISA Ehrlichiosis IgM es estable después de abrir hasta 30 días. Esta estabilidad puede variar según las condiciones de la prueba y el medio ambiente. Por lo tanto, se sugiere controlar el rendimiento del producto utilizando controles internos del kit y criterios de validación técnica.

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

PREPARO DE LOS REACTIVOS DE TRABAJO Solución de Lavado

Diluir el contenido del Lavado Concentrado (Reactivo N° 3) en 1000 mL de agua destilada o desionizada. Una vez preparada, la solución se puede conservar entre 2 y 30 °C hasta 30 días. Puede almacenarse a temperatura ambiente. Si ocurre cristalización, calentar a 37°C hasta que se disuelva.

Solución de Conjugado

Diluya el Conjugado Concentrado (Reactivo N° 2) en la proporción de 1: 101 en Diluyente (Reactivo N° 4). Prepare la solución al realizar la prueba.
Para realizar una prueba usando todos los pocillos del kit, mezcle 110 µL del Conjugado Concentrado en 11 mL de Diluyente.
Para realizar un ensayo con 8 pocillos (1 tira), mezcle 10 µL de conjugado concentrado en 1 ml de diluyente.

IMPORTANTE: La solución de conjugado diluida 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 N° 4), si la prueba se va a realizar por duplicado. Tape el tubo y agite suavemente o mezcle manualmente invirtiendo. Las diluciones no se pueden almacenar.

SUSTRATO

El Sustrato está listo para su uso.

TÉCNICA

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

Antes de comenzar el ensayo, colocar todos los reactivos, muestras y controles para estabilizarse a temperatura ambiente (15 - 30°C) durante al menos 40 minutos.

- 1-** Separar las cavidades a ser utilizadas considerando: Controles y Muestras (se recomiendan pruebas duplicadas). Retornar las tiras de la microplaca que no serán utilizadas para el embalaje original sellado.
- 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. **Obs: Los conroles están listos para usar, no hay necesidad de diluirlos.**
- 4-** Pipetear 100 µL de las muestras previamente diluidas en los pocillos previamente determinadas. El la cavidad Branco (OPCIONAL), si ha elegido, pipetear solo 100 µL del diluyente.
- 5-** Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cubrir las cavidades con sellador de placas.
- 6-** Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37°C ± 2°C.
- 7-** Retirar el sellador de las cavidades.
- 8-** Desechar el contenido de las cavidades por aspiración (Lavadora) o por decantación (Manual). Usar 300 µL aproximadamente de Solución de Lavado, **previamente preparada**, e efectuar un total de cinco (5) ciclos de lavado. Agitar durante 3 segundos con cada lavado. Para la garantía del secado da placa, al final del lavado, batir la placa por algunos segundos em papel absorbente.
- IMPORTANTE:** Lavado/secado deficiente puede causar resultados inadecuados.
- 9-** Pipetear 100 µL de Conjugado previamente diluido en todos los pocillos.
- 10-** Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cubrir las cavidades con sellador de placas.
- 11-** Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos em una incubadora a 37°C ± 2°C.
- 12-** Retirar el sellador de las cavidades.
- 13-** Repetir el ítem 8.
- 14-** Pipetear 100 µL de Sustrato en todas las cavidades.
- 15-** Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cubrir las cavidades con sellador de placas.
- 16-** Incubar durante 10 minutos ± 2 minutos em una incubadora a 37°C ± 2°C.
- 17-** Retirar el sellador de las cavidades.
- 18-** Pipetear 100 µL de Solución de Parada en todas las cavidades.
- 19-** Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos.
- 20-** Leer utilizando filtro doble: 450 nm / 630 nm en hasta 10 minutos (máximo).

VERIFICACIÓN DE LA TÉCNICA

Verifique si los resultados obtenidos para lectura do Blanco y dos Controles son compatibles con los valores presentados abajo:

ITEM	ABSORBANCIA (FILTRO DOBLE)
Blanco	< 0,100
Control Negativo	0,050 a 0,250
Control Positivo	> 0,800

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 Promedio del Control Negativo + 0,500

Ejemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
	A1 = 0,153
Control Negativo	A2 = 0,157
Cut Off = Absorbancia promedio del Control Negativo + 0,500	(0,153 + 0,157) / 2 + 0,500 = 0,655

Calcular el Índice dividiendo la absorbancia de la muestra por el valor de Cut Off.

Ejemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Muestra	1,680
Valor de Cut Off	0,655
Índice: Abs. de la Muestra / Valor de Cut Off	1,680 / 0,655 = 2,34

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	CUALITATIVO
	ÍNDICE
Negativo	< 0,9
Positivo	> 1,1
Indeterminado	0,9 y 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 mediante 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 recogida. Los resultados que proporciona este kit deben ser interpretados por el profesional médico responsable, y no es el único criterio para determinar el diagnóstico y / o tratamiento del paciente.

LIMITACIONES DEL PROCESO

La interpretación de un test diagnóstico, no debe ser establecida con base en un sólo ensayo. Se deben incluir otros testes de confirmación, antes que una muestra sea considerada positiva. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición. Todos los resultados deben ser interpretados en conjunto con otras informaciones clínicas disponibles antes del diagnóstico descriptivo de la enfermedad.

INTERFERENTES

No se observó interferencia para Triglicéridos 1500 mg/dL, Ácido Ascórbico 2 g/dL, Creatina 200 mg/dL, Bilirrubina 1 g/dL, Albumina 2 g/dL, Hemoglobina 1000 mg/dL, Ácido Oxálico 60 mg/dL, Fator Reumatóide 980 UI/mL, Proteína C Reactiva 41,2 mg/dL e Anti-Estreptolisina O 1023 UI/mL.

REACTIVIDAD CRUZADA

Se realizó un estudio de reactividad cruzada, evaluando 35 muestras negativas para anticuerpos IgM contra *Ehrlichia canis*, pero positivas para otras infecciones. Se analizaron 6 muestras positivas para Brucelosis, 5 muestras positivas para Moquillo, 1 muestra positiva para Parvovirus, 12 muestras positivas para Babesiosis, 4 muestras positivas para Enfermedad del Gusano del Corazón, 4 muestras positivas para Leptospirosis y 3 muestras positivas para Leishmaniasis. No se observó reactividad cruzada con ninguna de las muestras. A pesar de los resultados encontrados, no se puede descartar por completo la posibilidad de reactividad cruzada. El diagnóstico final debe considerar los datos clínicos del paciente junto con otros datos de laboratorio.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

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 medidas.

DESEMPEÑO DEL PRODUCTO

PRECISIÓN

Repetibilidad

La repetibilidad se calculó a partir de 10 determinaciones sucesivas, utilizando 3 muestras con diferentes valores. Los siguientes resultados fueron obtenidos:

REPETIBILIDAD	ABSORBANCIA		
	1	2	3
Media	1,492	0,775	0,227
Desviación Estándar	0,077	0,012	0,007
Coefficiente de Variación (%)	5,18	1,51	3,28

Reproducibilidad

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

REPRODUCTIBILIDAD	ABSORBANCIA		
	1	2	3
Media	1,473	0,793	0,197
Desviación Estándar	0,077	0,020	0,032
Coefficiente de Variación (%)	5,26	2,46	16,31

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICA

En el VETLISA Ehrlichiosis IgM, las muestras clínicas se analizaron en comparación con otro método de inmunoensayo enzimático. Los resultados muestran que la sensibilidad clínica del kit es del 97,8% y la especificidad clínica es del 96,4%.

Método		Referencia		Total
VETLISA Ehrlichiosis IgM	Resultado	Positivo	Negativo	
	Positivo	44	2	46
	Negativo	1	53	54
Resultado Total		45	55	100

Sensibilidad Clínica: 97,8% (44/45) - IC 95%: 91,5% - 100%
Especificidad Clínica: 96,4% (53/55) - IC 95%: 93,5% - 100%
Precisión: 97,0% (44+53) / (55+45)

SIGNIFICACIÓN CLÍNICA

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 el perro varía entre 8 y 20 días, y los signos clínicos Las observaciones incluyen petequias en la piel y membranas mucosas, ganglios linfáticos agrandados, hepatomegalia y esplenomegalia, apatía, pérdida de peso, falta de apetito, anorexia, fiebre, secreción nasal y ocular. Cuando el tratamiento no da como resultado la eliminación total del organismo, pueden producirse recaídas posteriores. La respuesta inmune del perro contra *Ehrlichia* es esencial para combatir la infección y también permite el diagnóstico por detección de anticuerpos en pruebas serológicas. La inmunoglobulina M (IgM), es la primera clase de anticuerpos producidos por el sistema inmunológico y su producción indica la aparición de una infección reciente. Así, la detección de IgM favorece el diagnóstico precoz y favorece el tratamiento precoz.

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. 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. Janeiro1991.
- 6- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

GARANTÍA DE CALIDAD

Antes de ser liberados para el consumo, todos los reactivos de Quibasa son testados por el Departamento de Control de Calidad. La calidad de los reactivos es asegurada hasta la fecha de validez mencionada en el embalaje, desde que sean almacenados y transportados en las condiciones adecuadas.

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rúa Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel.: +55 31 3439.5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

ATENDIMIENTO AL 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 04/09/2022 con el número 10.531/2022.

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

Revisión: Octubre/2022

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 ESTA DAÑADA
	NO REUTILIZA		PRODUCTO ESTERILIZADO
	PRECAUCIÓN		PELIGRO

VETLISA EHRLICHIOSIS IgM

REF VET066

USAGE INSTRUCTIONS

PURPOSE

Test for qualitative determination of IgM antibodies against *Ehrlichia canis* in serum or plasma of dogs, through immunoenzymatic assay, in microplate. For *in vitro* diagnostics only.

PRINCIPLE OF ACTION

Methodology: Enzyme immunoassay or immunoenzymatic assay.

VETLISA Ehrlichiosis IgM is a solid phase immunoenzymatic assay, based on the immunocapture principle for the qualitative detection of IgM antibodies against *Ehrlichia canis* in serum or plasma of dogs. Antibodies against Ehrlichia canis present in the sample bind to the recombinant antigens of *Ehrlichia canis* coated on the microplate, forming immobilized antigen-antibody immunocomplexes. After the initial incubation, the microplate is washed to remove unbound materials. The Conjugate, formed by anti-dog IgM antibody linked to Peroxidase, is added and binds to IgM antibodies linked to the antigens immobilized on the plate. After a second incubation, the microplate is washed to remove unbound materials. Then, the Substrate is added and incubated, producing a blue color, whose intensity is proportional to the amount of IgM antibodies against *Ehrlichia canis* present in the sample. The Stop Solution is added to stop the reaction, promoting a change of color from blue 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 wells each, impregnated with *Ehrlichia canis* recombinant antigen.

2- Concentrated Conjugate (100X) - Store at 2 to 8°C. Contains: Dog anti-IgM antibody conjugated to peroxidase and protein stabilizer.

3- Concentrated Wash (20X) - Store at 2 to 8°C. Contains: Buffer solution, surfactant and preservative.

4- Diluent - Store at 2 to 8°C. Contains: Buffer solution, stabilizers, dye, surfactant and preservative.

5- Substrate TMB - Store between 2 and 8°C. Contains: Solution containing 3, 3', 5, 5' - Tetramethylbenzidine (TMB), Urea Peroxide and preservative.

6- Stop Solution - Store at 2 to 8°C. Contains: Sulfuric Acid Solution 1 mol / L.

7- Negative Control - Store between 2 and 8°C. Contains: Serum containing negative serum for IgM antibodies against *Ehrlichia canis* and protein stabilizer. **Potentially infective.**

8- Positive Control - Store between 2 and 8°C. Contains serum containing positive serum for IgM antibodies against *Ehrlichia canis* and protein stabilizer. **Potentially infective.**

9- Plate Sealers

PRESENTATIONS

COMPONENTS	PRESENTATION			
	1	2	3	4
	96 wells	192 wells	480 wells	960 wells
1- Sensitized Plate	1 unit	2 units	5 units	10 units
2- Concentrated Conjugate (100x)	1 x 300 µL	2 x 300 µL	5 x 300 µL	10 x 300 µL
3- Concentrated Wash (20x)	1 x 50 mL	2 x 50 mL	5 x 50 mL	10 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	2 x 1 mL	5 x 1 mL	10 x 1 mL
8- Positive Control	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL	10 x 1 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 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.

STORAGE ANS TRANSPORT CONDITIONS

The product storage temperature is 2 to 8 °C. Transport can be done at room temperature (up to 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 -20 °C.

PROCESS DESCRIPTON

Stability After Open

The results of the stability test show that the VETLISA Ehrlichiosis IgM kit is stable after being opened up to 30 days. This stability may vary according to the test conditions and the environment. Therefore, it is suggested to monitor the product's performance using internal kit controls and the technique validation criteria.

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

PREPARATION OF WORK REAGENTS

Washing Solution

Dilute the contents of the Concentrated Wash (Reagent N° 3) in 1000 mL of distilled or deionized water. After preparation, the solution can be stored at 2 to 30 °C up to 30 days. If crystallization occurs, heat to 37°C until dissolved.

Conjugate Solution

Dilute the Concentrated Conjugate (Reagent N° 2) in the proportion of 1: 101 in Diluent (Reagent N° 4). Prepare the solution when performing the test.

To perform a test using all the wells of the kit, mix 110 µL of the Concentrated Conjugate in 11 mL of Diluent.

To perform an assay using 8 wells (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.

Dilution of Samples

In a test tube, dilute 5 µL of the sample in 500 µL of Diluent (Reagent N° 4), if the test is going to be performed in duplicate. Cap the tube and vortex gently or mix manually by inversion. Dilutions cannot be stored.

SUBSTRATE

The Substrate is ready to use.

TECHNIQUE

For use in automatic equipment, consult the Customer Service Department (SAC).

Before starting the test, place all reagents, samples and controls to stabilize at room temperature (15 - 30 °C) for at least 40 minutes.

1- Separate the cavities to be used considering: Controls and Samples (it is recommended to test in duplicate). Return the unused strips of the microplate to the original sealed package.

2- Separate the first cavity for Blank (OPTIONAL).

3- Pipette 100 µL of the Negative Control and Positive Control in the previously determined wells. **Note: The controls are ready for use, there is no need to dilute them.**

4- Pipette 100 µL of the samples previously diluted in the previously determined wells. In the Blank cavity (OPTIONAL), if you have made the option, pipette only 100 µL of the diluent.

5- Gently mix for ± 10 seconds. Cover the wells with plate sealer.

6- Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37°C ± 2°C.

7- Remove the sealer from the cavities.

8- Discard the contents of the cavities by aspiration (Washer) or by decantation (Manual). Use approximately 300 µL of Washing Solution, **previously prepared**, and perform a total of five (5) wash cycles. Shake for 3 seconds with each wash. To guarantee the drying of the plate, at the end of the washing, beat the plate for a few seconds on absorbent paper.

IMPORTANT: Poor washing / drying can cause inadequate results.

9- Pipette 100 µL of Conjugate previously diluted in all wells.

10- Gently homogenize for ± 10 seconds. Cover the cavities with the plate sealer.

11- Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37°C ± 2°C.

12- Remove the plate sealer from the cavities.

13- Repeat item 8.

14- Pipette 100 µL of Substrate into all wells.

15- Gently homogenize for ± 10 seconds. Cover the cavities with the plate sealer.

16- Incubate for 10 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37°C ± 2°C.

17- Remove the plate sealer from the cavities.

18- Pipette 100 µL of Stop Solution into all wells.

19- Gently mix for ± 10 seconds.

20- Read using a double filter: 450 nm / 630 nm in up to 10 minutes (maximum).

TECHNIQUE VERIFICATION

Verify if the results obtained from reading the Blank and the Controls are compatible with the specification above:

ITEM	ABSORBANCE (DUAL FILTER)
Blank	< 0.100
Negative Control	0.050 a 0.250
Positive Control	> 0.800

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

CALCULATIONS

Calculate the Cut Off according to the following formula:
Cut Off = Average Negative Control Absorbance + 0.500
Example:

ITEM	ABSORBANCIA
	A1 = 0.153
Negative Control	A2 = 0.157
Cut Off = Negative Control Average Absorbance + 0.500	(0.153 + 0.157) / 2 + 0.500 = 0.655

Calculate the index by dividing the absorbance of the sample by the cut off value.
Example:

ITEM	ABSORBANCE
Sample	1.680
Cut Off Value	0.655
Index: Sample Abs. / Cut Off Value	1.680 / 0.655 = 2.34

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	INDEX
Negative	< 0.9
Positive	> 1.1
Undetermined	0.9 y 1.1

Note: In the case of an undetermined result, the sample must be re-analyzed. Samples that obtain repeatedly indeterminate results must 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 sample collected must prevail. The results provided by this kit must be interpreted by the responsible medical professional, and it 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 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 clinical information available before the definitive diagnosis of the disease.

INTERFERENTS

No interference was observed for Triglycerides 1500 mg/dL, Ascorbic Acid 2 g/dL, Creatine 200 mg/dL, Bilirubin 1 g/dL, Albumin 2 g/dL, Hemoglobin 1000 mg/dL, Oxalic Acid 60 mg/dL, Factor Rheumatoid 980 IU/mL. C Reactive Protein 41.2 mg/dL and Anti-streptolysin O 1023 IU/mL.

CROSS REACTIVITY

A cross-reactivity study was carried out, evaluating 35 samples negative for IgM antibodies against *Ehrlichia canis*, but positive for other infections. 6 positive samples for Brucellosis, 5 positive samples for Distemper, 1 positive sample for Parvovirus, 12 positive samples for Babesiosis, 4 positive samples for Heartworm, 4 positive samples for Leptospirosis and 3 positive samples for Leishmaniasis were tested. No cross reactivity was observed with any of the samples. Despite the results found, the possibility of cross-reactivity cannot be completely ruled out. The final diagnosis should consider the patient's clinical data along with other laboratory data.

INTERNAL QUALIT 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 measurements.

PRODUCT PERFORMANCE

ACCURACY

Repeatability

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

REPEATABILITY	ABSORBANCE		
	1	2	3
Mean	1.492	0.775	0.227
Standard Deviation	0.077	0.012	0.007
Coefficient of Variation (%)	5.18	1.51	3.28

Reproducibility

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

REPRODUCIBILITY	ABSORBANCE		
	1	2	3
Mean	1.473	0.793	0.197
Standard Deviation	0.077	0.020	0.032
Coefficient of Variation (%)	5.26	2.46	16.31

CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

In the VETLISA Ehrlichiosis IgM, clinical samples were analyzed in comparison with another method of Enzyme immunoassay. The results show that the clinical sensitivity of the kit is 97.8% and the clinical specificity is 96.4%.

VETLISA Ehrlichiosis IgM	Method	Reference		Total
	Result	Positive	Negative	
	Positive	44	2	46
	Negative	1	53	54
Total Result		45	55	100

Clinical Sensitivity: 97.8% (44/45) - IC 95%: 91.5% - 100%

Clinical Specificity: 96.4% (53/55) - IC 95%: 93.5% - 100%

Precision: 97.0% (44+53) / (55+45)

CLINICAL SIGNIFICANCE

Ehrlichiosis is a disease caused by bacteria of the genus *Ehrlichia*, which parasitize blood cells such as leukocytes, erythrocytes, endothelial cells and platelets. Transmission occurs through the bite of the brown tick (*Rhipicephalus sanguineus*), which is contaminated with the bacteria after the blood meal in dogs with high parasitemia. The incubation period for ehrlichiosis in the dog varies from 8 to 20 days, and the clinical signs observed include petechiae on the skin and mucous membranes, enlarged lymph nodes, hepatomegaly and splenomegaly, apathy, weight loss, lack of appetite, anorexia, fever, runny nose and eyepiece. When treatment does not result in the total elimination of the organism, subsequent relapses may occur. The dog's immune response against *Ehrlichia* is essential to fight infection and also allows diagnosis by detecting antibodies in serological tests. Immunoglobulin M (IgM), is the first class of antibodies produced by the immune system, and its production indicates the occurrence of recent infection. Thus, the detection of IgM favors early diagnosis and favors early treatment.

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. 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. Janeiro1991.
- 6- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

QUALITY GUARANTEE

Before being released for consumption, all Quibasa reagents are tested by the Quality Control Department. The quality of the reagents is assured until the validity date mentioned on the packaged, 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.: +55 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 04/09/2022 with the number 10.531/2022.

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

Review: October/2022

UNIVERSAL SYMBOLOGY

CATALOG NUMBER

LOT NUMBER

MANUFACTURING DATE

VALIDITY DATE
(last day of the month)

TEMPERATURE LIMIT
(store)

CONTENT IS SUFFICIENT
FOR <N> TEST

SEE INSTRUCTIONS
FOR USE

IN VITRO DIAGNOSTIC
PRODUCT

KEEP AWAY
FROM SUNLIGHT

DO NOT REUSE

CAUTION

MADE BY

CONTROL

POSITIVE CONTROL

NEGATIVE CONTROL

BIOLOGICAL RISK

FLAMMABLE

CORROSIVE

TOXIC

DO NOT USE IF
PACKAGE IS
DAMAGED

PRODUCT
STERILIZED

DANGER