

VETLISA LEISHMANIOSE IgG

REF VET043

INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE

Teste para determinação qualitativa de anticorpos contra *Leishmania infantum* em soro ou plasma canino, 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* presentes na amostra, se ligam ao antígeno recombinante k39 de *L. infantum*, que reveste a microplaca, formando complexos imobilizados antígeno - anticorpos. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados. O Conjugado, formado por anticorpo anti-IgG de cão ligado a peroxidase, se liga ao complexo antígeno-anticorpo imobilizado na placa. Em seguida, a microplaca é lavada e incubada com Substrato. A intensidade da cor azul produzida pela adição do Substrato é proporcional a quantidade de anticorpos contra *Leishmania* presente na amostra. A Solução de Parada é adicionada para finalizar a reação, promovendo uma mudança de cor para amarelo, medida em um leitor de microplacas.

REAGENTES

- 1- Placa Sensibilizada** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Placa de poliestireno, dividida em 12 tiras de 8 poços cada, impregnada com antígeno recombinante de *L. infantum*.
2- Conjugado Concentrado (100X) - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução de anticorpo anti-IgG de cão ligado a Peroxidase.
3- Lavagem Concentrada (20X) - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução Tamponada, surfactante e conservante.
4- Diluente - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução Tamponada, surfactante, estabilizante e conservante.
5- Substrato TMB - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução contendo Tetrametilbenzidina (TMB < 1,0 mg/mL), Solução de Ácido Cítrico < 5% e Peróxido de Uréia < 1 %.
6- Solução de Parada - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução de Ácido Sulfúrico 1N.
7- Controle Negativo - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Soro negativo para Leishmaniose canina e conservante. **Potencialmente infeccioso.**
8- Controle Positivo - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Soro positivo para Leishmaniose canina e conservante. **Potencialmente infeccioso.**
9 - Seladores de Placa

APRESENTAÇÃO

REAGENTES	Apresentação		
	1	2	3
1- Placa Sensibilizada	1 unidade (96 cavidades)	2 unidades (192 cavidades)	5 unidades (480 cavidades)
2- Conjugado Concentrado (100X)	1 x 350 µL	2 x 350 µL	5 x 350 µL
3- Lavagem Concentrada (20X)	1 x 50 mL	2 x 50 mL	5 x 50 mL
4- Diluente	1 x 60 mL	2 x 60 mL	5 x 60 mL
5- Substrato TMB	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL
6- Solução de Parada	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL
7-Controle Negativo	1 x 1,0 mL	2 x 1,0 mL	5 x 1,0 mL
8- Controle Positivo	1 x 1,0 mL	2 x 1,0 mL	5 x 1,0 mL
9- Seladores de Placa	3 unidades	6 unidades	15 unidades

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no quadro anterior.
- Instruções de uso (manual).

Materiais necessários, não contidos no kit:

- 1-** Jogo de pipetas calibradas, capazes de dispensar volumes entre 5 e 1000 µL, com coeficiente de variação menor que 1,5%.
2- Repipetador ou pipeta multicanal calibrada para volume de 100 µL, com coeficiente de variação menor que 1,5% (opcional).
3- Lavadora de microplaca (opcional).
4- Leitora de ELISA com capacidade de 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 diluída.
8- Água destilada ou deionizada.
9- Ferramentas de Controle de Qualidade.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

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

CUIDADOS ESPECIAIS

- 1- Somente para uso veterinário, para diagnóstico *in vitro*.**
2- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.
3- O profissional deve seguir com rigor as normas e rotinas de segurança ao manipular amostras biológicas. O uso de luvas descartáveis e outros equipamentos de proteção individual é imprescindível.
4- IMPORTANTE: Antes de iniciar o ensaio, permita que todos os componentes do kit alcancem a temperatura ambiente. Abrir o envelope contendo as cavidades somente após alcançar a temperatura ambiente.
5- Não misture reagentes de kits ou lotes diferentes. Não utilize componentes do kit vencidos.

- 6-** Não coma, beba ou fume no local de realização do ensaio.
7- Não pipete reagentes ou amostra(s) utilizando a boca. Não utilize a mesma ponteira para pipetar diferentes amostras.
8- Os Controles Positivo e Negativo devem ser retestados para cada novo ensaio realizado.
9- A Solução de Parada contém Ácido Sulfúrico, que é um ácido forte. Portanto, manuseá-lo com o devido cuidado.
10- Manusear os componentes do kit com o devido cuidado, a fim de evitar sua contaminação. Tome cuidado especial com o substrato, que é uma solução sensível a luz. Utilize ponteiras e recipientes novos ou adequadamente limpos para seu manuseio e não permita sua exposição a luz forte durante sua estocagem ou nos períodos de incubação do ensaio.
11- Utilizar água recém destilada ou deionizada e isenta de contaminantes no preparo de soluções.
12- Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.
13- Antes de realizar a leitura da placa, assegurar que o fundo das microcavidades estejam limpos e secos. Garantir que não haja bolhas na superfície do líquido.
14- 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.
15- 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.
16- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.
17- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

AMOSTRAS

Hemólise, lipemia e bilirrubina (icterícia) podem interferir no resultado do teste. O resultado obtido de amostras nestas condições deve ser avaliado com cautela. As amostras podem ser conservadas sob refrigeração, entre 2 e 8°C, pelo período máximo de 5 dias. Se as amostras não puderem ser analisadas dentro de 5 dias, estocar por até 30 dias a -20°C (freezer). Utilizar soro ou plasma (EDTA ou heparina).

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

Estabilidade Após Aberto

Os resultados do teste de estabilidade comprovam que o kit VETLISA LEISHMANIOSE IgG é estável 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 pontos para o uso.

PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO E AMOSTRAS
1- Solução de Lavagem
Diluir o conteúdo da Lavagem Concentrada (Reagente Nº3) em 1000 mL de água recentemente destilada ou deionizada. Conservar entre 2 e 8°C até a data de validade impressa no frasco. Caso ocorra cristalização, aquecer a 37°C até dissolução. Pode ser armazenada em temperatura ambiente.

2- Solução de Conjugado

Diluir o Conjugado Concentrado (Reagente 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.

3- 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

Antes de iniciar o ensaio, colocar todos os reagentes, Controles e Amostras para estabilizarem em temperatura ambiente (15 - 30°C) por no mínimo 30 minutos. Retornar as tiras não utilizadas para a embalagem original selada.
1- Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Controles e Amostras (podendo ser testados em duplicata).
2- Separar a primeira cavidade para o Branco (OPCIONAL).
3- Pipetar 100 µL do Controle Negativo e do Controle Positivo nas cavidades previamente determinadas. **Obs: Os controles estão prontos para o uso, não sendo necessário diluí-los.**
4- Pipetar 100 µL das Amostras previamente diluídas nas cavidades previamente determinadas. Na cavidade Branco (OPCIONAL), caso tenha feito a opção, pipetar somente 100 µL do diluente.
5- Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cobrir as cavidades com selador de placa.
6- Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
7- Descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (lavadora) ou por decantação (manual). Usar 300µL/cavidade aproximadamente de Solução de Lavagem previamente diluída, para um total de três (3) ciclos de lavagem. Agitar por três segundos em cada lavagem. Para a garantia da secagem da placa, ao final da lavagem, bater a placa por alguns segundos em papel absorvente.
IMPORTANTE: Lavagem/secagem deficiente pode causar resultados inadequados.
8- Pipetar 100 µL de Conjugado previamente diluído em cada cavidade, inclusive na cavidade do Branco.

- 9-** Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cobrir as cavidades com selador de placa.
- 10-** Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 11-** Repetir o item 7.
- 12-** Adicionar 100 µL de Substrato TMB em cada microcavidade.
- 13-** Homogeneizar gentilmente durante ± 3 segundos. Cobrir as cavidades com selador de placa.
- 14-** Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente, protegido da luz.
- 15-** Retirar o selador de placas das microcavidades.
- 16-** Pipetar 100 µL de Solução de Parada em cada microcavidade.
- 17-** Homogeneizar gentilmente durante ± 3 segundos.
- 18-** Leia a absorbância em leitora de ELISA em filtro duplo de 450nm (filtro primário) / 630nm (filtro secundário) em até no máximo 10 minutos após adição da Solução de Parada.

VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

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

ITEM	ABSORBÂNCIA (FILTRO DUPLO)
Branco	< 0,050
Controle Negativo	< 0,450
Controle Positivo	> 1,000

Caso os valores se encontrem fora dos valores esperados, deve-se repetir o ensaio.

CÁLCULO DO CUT OFF

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

Cut Off = Absorbância média do Controle Negativo + 0,500
--

CÁLCULO DO ÍNDICE DAS AMOSTRAS

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

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

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS - QUALITATIVO

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

IMPORTANTE: Amostras com resultado indeterminado devem ser retestadas. Amostras que apresentem resultados indeterminados repetidamente devem ser testadas por método alternativo. Caso esta amostra apresente resultado positivo, então deve ser considerada como positiva.

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

A interpretação de um teste diagnóstico, não deve ser estabelecida com base em um único ensaio. Devem-se incluir outros testes de confirmação, antes que uma amostra seja considerada positiva. Um resultado negativo não exclui a possibilidade de exposição. Enfim, todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com histórico de vacinação, informações clínicas e laboratoriais disponíveis.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

O Laboratório Clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, onde procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente estabelecidos. É importante ressaltar que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica característica, que deve ser monitorada pelos próprios laboratórios. Para tanto, é recomendável a utilização de controles, que permitam avaliar a precisão e a exatidão das medições.

DESEMPENHO DO PRODUTO PRECISÃO

Repetibilidade

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

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

Reprodutibilidade

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

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

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

O kit VETLISA LEISHMANIOSE IgG foi testado em comparação com outros métodos. Foram analisadas amostras clínicas em comparação com outros métodos de enzima imunensaio. Os resultados mostram que a sensibilidade clínica do kit é > 99,9% e a especificidade clínica é de 96%.

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

Sensibilidade Clínica: >99,9% (150/150) - IC 95%: 97,47 - 100%
Especificidade Clínica: 96% (144/150) - IC 95%: 91,82 - 98,58%
Precisão: 98% [(144 + 150) / (150 + 150)]

REAÇÃO CRUZADA

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

REAÇÃO COM CÃES VACINADOS

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

SIGNIFICADO CLÍNICO

A Leishmaniose é uma doença infecciosa e zoonótica causada por protozoários do gênero *Leishmania*, e transmitida pela picada da fêmea de flebótomos. O período de incubação da leishmaniose pode variar de poucas semanas a vários anos, e as principais manifestações clínicas são linfadenopatia generalizada, dermatite esfoliativa, emagrecimento progressivo e ceratoconjuntivite. Devido a alta frequência de assintomáticos, o diagnóstico sorológico é uma ferramenta eficaz e indicada pelo Ministério da Saúde. Segundo os órgãos oficiais, o diagnóstico da Leishmaniose deve considerar a triagem do cão utilizanso ensaios imunocromatográficos (testes rápidos), seguido do ensaio imunoenzimático de caráter confirmatório.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.
- 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 experimentally infected phlebotomine sandfl ies. Parasite, 1994, 7, 311-318.
- RIBEIRO VM. Leishmanioses. In: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais;
- DENARDI AB, ROZA MR, organizadores. PROMOVET Pequenos Animais: Programa de Atualização em Medicina Veterinária: Ciclo 1. Porto Alegre: Artmed Panamericana; 2016.p.107- 50.
- Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1ª ed. Brasília- DF, 2006.

GARANTIA DE QUALIDADE

Antes de serem liberados para o consumo, todos os reagentes produzidos pela **Bioclin** 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 02/08/2019 sob o número 10.264/2019.

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

Revisão: Abril/2023

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



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
ESTERELIZADO



CUIDADO



PERIGO

VETLISA LEISHMANIA IgG

REF
VET043

INSTRUCCIONES DE USO

FINALIDAD

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

PRINCIPIO DE ACCIÓN

Metodología: Enzimainmunoensayo o inmunoenzimatico

Este producto es un ensayo inmunoenzimático en fase sólida, basado en el principio de inmunocaptura para la detección cualitativa de anticuerpos IgG contra *Leishmania* en suero o plasma de perros. Los anticuerpos contra *Leishmania* presentes en la muestra, se unen al antígeno recombinante k39 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 perro unido a la peroxidasa, se une al complejo antígeno-anticuerpo inmovilizado en la placa. Luego, la microplaca se lava y se incuba con Sustrato. La intensidad del color azul producido por la adición del Sustrato es proporcional a la cantidad de anticuerpos contra *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.

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 perro 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. Contiene: Suero no reactivo para leishmaniasis y conservante. **Potencialmente infeccioso.**
- 8- Control Positivo** - Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Suero reactivo para leishmaniasis y conservante. **Potencialmente infeccioso.**
- 9- Selladores de Placa**

PRESENTACIONES

REACTIVOS	Presentación		
	1	2	3
1- Placa Sensibilizada	1 unidad (96 cavidades)	2 unidades (192 cavidades)	5 unidades (480 cavidades)
2- Conjugado Concentrado (100x)	1 x 350 µL	2 x 350 µL	5 x 350 µL
3- Lavado Concentrado (20x)	1 x 50 mL	2 x 50 mL	5 x 50 mL
4- Diluyente	1 x 60 mL	2 x 60 mL	5 x 60 mL
5- Sustrato TMB	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL
6- Solución de Parada	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL
7- Control Negativo	1 x 1,0 mL	2 x 1,0 mL	5 x 1,0 mL
8- Control Positivo	1 x 1,0 mL	2 x 1,0 mL	5 x 1,0 mL
9- Selladores de Placa	3 unidades	6 unidades	15 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- Conjunto de pipetas calibradas, capaces de dispensar volúmenes entre 5 y 1000 µL, con un coeficiente de variación inferior al 1,5%.
- 2- Pipeta repetidora o multicanal calibrada a 100 µL de volumen, con un coeficiente de variación inferior al 1,5% (opcional).
- 3- Lavadora de microplaca (opcional).
- 4- Lectora de ELISA con capacidad de absorbencia en 450 y 630 nm de longitud de onda.
- 5- Papel absorbente para secar las microcavidades.
- 6- Cronómetro o reloj.
- 7- Frasco para almacenar la Solución de Lavado, después de diluida.
- 8- Agua destilada o desionizada.
- 9- Herramientas de Control de Calidad.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

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

CUIDADOS ESPECIALES

- 1- Solamente para uso veterinario, para diagnostico *in vitro*.**
- Seguir estrictamente la metodología propuesta para obtener resultados exactos.
- El profesional debe seguir estrictamente las normas y rutinas de seguridad al manipular muestras biológicas. El uso de guantes desechables y otros equipos de protección personal es esencial.
- 4- IMPORTANTE:** Antes de comenzar la prueba, permita que todos los componentes del kit alcancen la temperatura ambiente. Abra el sobre que contiene los pocillos solo después de alcanzar la temperatura ambiente.
- No mezcle reactivos de diferentes kits o lotes. No utilice componentes del kit caducados.

6- No coma, beba ni fume en el sitio de prueba.

7- No pipetee reactivos ni muestras con la boca. No use la misma punta para pipetear diferentes muestras.

8- Los controles positivo y negativo se deben volver a probar para cada nueva prueba realizada.

9- La Solución de Parada contiene Ácido Sulfúrico, que es un ácido fuerte. Por lo tanto, manipúlelo con el debido cuidado.

10- Manipule los componentes del kit con el debido cuidado para evitar la contaminación. Tenga especial cuidado con el sustrato, que es una solución sensible a la luz. Utilice puntas y recipientes nuevos o adecuadamente limpios para su manipulación y no permita que estén expuestos a luz intensa durante el almacenamiento o durante los períodos de incubación del ensayo.

11- Use agua recién destilada o desionizada que esté libre de contaminantes al preparar soluciones.

12- Pipetear los reactivos siempre en el mismo orden para minimizar la diferencia de tiempo de reacción entre las microcavidades.

13- Antes de leer la placa, asegurar que el fondo de las microcavidades están limpias y secas. Asegúrese de que no haya burbujas en la superficie del líquido.

14- Se recomienda la aplicación de la ley local, estatal y federal de protección ambiental para la eliminación de reactivos y material biológico se hace de acuerdo con la legislación vigente.

15- Para obtener información relacionada con la seguridad biológica o en caso de accidentes con el producto, consultar la FISPQ (Ficha de Informaciones de la Seguridad de Productos Químicos) disponibles en el site www.bioclin.com.br o solicitando a través del SAC (Servicio de Asesoría al Cliente) de Quibasa.

16- No utilice el producto en caso de daños en su embalaje.

17- Es esencial que los instrumentos y equipos utilizados estén adecuadamente calibrados y sometidos a mantenimientos periódicos.

MUESTRAS

La hemólisis, la lipemia y la bilirrubina (ictericia) pueden interferir con el resultado de la prueba. El resultado obtenido de las muestras en estas condiciones debe evaluarse con precaución. Las muestras pueden ser conservadas bajo refrigeración, entre 2 y 8°C , por el período máximo de 5 días.

Si las muestras no pudieran ser analizadas dentro de 5 días, pueden ser almacenadas por hasta 30 días a temperatura de -20°C (freezer). Utilizar suero o plasma (EDTA o Heparina).

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

Estabilidad Después de Abrir

Los resultados de la prueba de estabilidad muestran que el kit VETLISA LEISHMANIA IgG es estable después por 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 Y MUESTRAS

1- Solución de Lavado

Diluir el contenido del Lavado Concentrado (Reactivo N° 3) en 1000 mL de agua recién destilada o desionizada. Almacenar a 2 a 8°C hasta la fecha de validez impresa en el frasco original. Caso ocurra cristalización, calentar a 37°C hasta su disolución. Puede ser almacenada a temperatura ambiente.

2- 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 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.

3- Diluição das Amostras

En un tubo de ensayo, diluya 15 µL de la muestra en 300 µL de Diluyente (Reactivo N° 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

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 están 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 durante 30 minutos a temperatura ambiente.
 - 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 tres (3) 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 temperatura ambiente.
- 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 temperatura ambiente, 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 TÉCNICA

Verifique que los resultados obtenidos para lectura los Controles y el Blanco sean compatibles con la especificación:

ITEM	ABSORBANCIA (FILTRO DOBLE)
Blanco	< 0,050
Control Negativo	< 0,450
Control Positivo	> 1,000

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

CALCULO DEL CUT OFF

Si los resultados de los controles son válidos, calcule el valor de corte con la siguiente fórmula:

Cut Off = Absorbancia promedio del Control Negativo + 0,500

CALCULO DEL ÍNDICE DE LAS MUESTRAS

Calcule el índice dividiendo la absorbancia de la muestra por el valor de corte. Ejemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Muestra	1,093
Control Negativo	0,201
Valor de Cut Off	0,201 + 0,500 = 0,701
Índice: Abs. de la Muestra / Valor de Cut Off	1,093 / 0,701 = 1,559

INTERPRETACIÓN DEL RESULTADO – CUALITATIVO

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

IMPORTANTE: Las muestras con resultados indeterminados deben volver a analizarse. Las muestras que muestran resultados indeterminados repetidamente deben analizarse mediante un método alternativo. Si esta muestra presentar un resultado positivo, entonces debe considerarse como positivo.

LIMITACIONES DE PRUEBA

La interpretación de una prueba diagnóstica no debe basarse en un solo ensayo. Se deben incluir otras pruebas confirmatorias antes de que una muestra se considere positiva. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición. De todos modos, todos los resultados deben interpretarse junto con el historial de vacunación, la información clínica y de laboratorio disponible.

CONTROL INTERNO DE CALIDAD

El Laboratorio Clínico debe poseer un programa interno de control de calidad, donde procedimientos, normas, límites y tolerancia para variaciones sean claramente establecidos. Es importante resaltar que todos los sistemas de medición presenten una variabilidad analítica característica, que debe ser controlada por los propios laboratorios. Por lo tanto, es recomendable la utilización de controles, que permiten evaluar la precisión y la exactitud de las dosificaciones.

DESEMPEÑO DEL PRODUCTO

PRECISIÓN

Repetibilidad

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

Repetibilidad	Muestra		
	1	2	3
Media	1,794	1,029	0,040
Desviación estándar	0,053	0,035	0,003
Coefficiente de Variación (%)	2,977	3,370	7,764

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:

Reproducibilidad	Muestra		
	1	2	3
Media	1,807	1,026	0,040
Desviación estándar	0,050	0,035	0,003
Coefficiente de Variación (%)	2,760	3,422	6,895

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICA

El VETLISA LEISHMANIA IgG analizó muestras clínicas en comparación con otros métodos de inmunoensayo enzimático. Los resultados muestran que la sensibilidad clínica del producto es >99,9% y la especificidad clínica es del 96%.

Método		Referencia		Total
VETLISA LEISHMANIA IgG	Resultado	Negativo	Positivo	
	Negativo	144	0	144
	Positivo	6	150	156
Resultado Total		150	150	300

Sensibilidad clínica: >99,9% (150/150) - IC 95%: 97,47 - 100%
Especificidad clínica: 96% (144/150) - IC 95%: 91,82 - 98,58%
Precisión: 98% [(144 + 150) / (150 + 150)]

REACCION CRUZADA

Este producto se probó con muestras de suero de animales diagnosticados como negativos para leishmaniasis canina y positivos para las siguientes enfermedades: erliquiosis, babesiosis, leptospirosis, anaplasmosis, moquillo, parvovirus e infección por *Trypanosoma cruzi*. El producto mostró un resultado negativo en todas las condiciones probadas.

REACCIÓN CON PERROS VACUNADOS

Este producto se probó con muestras de suero de perros vacunados contra la Leishmaniasis, con una vacuna disponible en el mercado. El producto fue negativo para todas las muestras analizadas.

SIGNIFICADO CLÍNICO

La Leishmaniasis es una enfermedad infecciosa y zoonótica causada por protozoos del género *Leishmania* y transmitida por la picadura de flebotomos. El período de incubación de la Leishmaniasis puede oscilar entre unas pocas semanas y varios años, y las principales manifestaciones clínicas son linfadenopatía generalizada, dermatitis exfoliativa, pérdida progresiva de peso y queratoconjuntivitis. Debido a la alta frecuencia de casos asintomáticos, el diagnóstico la serología es una herramienta eficaz e indicada por el Ministerio de Salud. Según los organismos oficiales, el diagnóstico de Leishmaniasis debe considerar el cribado del perro mediante ensayos inmunocromatográficos, seguido del ensayo inmunoenzimático confirmatorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- QUIBASA: Datos del Departamento de Investigación y Desarrollo.
- 2- 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 experimentally infected phlebotomine sandflies. Parasite, 1994, 7, 311-318.
- 3- RIBEIRO VM. Leishmanioses. In: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais;
- 4- DENARDI AB, ROZA MR, organizadores. PROMOVET Pequenos Animais: Programa de Atualização em Medicina Veterinária: Ciclo 1. Porto Alegre: Artmed Panamericana; 2016.p.107- 50.
- 5- Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1ª ed. Brasília- DF, 2006.

GARANTÍA DE CALIDAD

Antes de ser liberados para el consumo, todos los reactivos de **Bioclin** 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

ATENIMIENTO AL CONSUMIDOR

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

Producto con licencia en el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento desde el 02/08/2019 con el número 10.264/2019.

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

Revisión: Abril/2023

REF

NUMERO DE CATALOGO

LOT

NUMERO DE LOTE

FECHA DE FABRICACIÓN

FECHA DE FABRICACIÓN

FECHA DE VALIDEZ (último día del mes)

FECHA DE VALIDEZ (último día del mes)

LÍMITE DE TEMPERATURA (tienda)

LÍMITE DE TEMPERATURA (tienda)

EL CONTENIDO ES SUFICIENTE PARA <N> PRUEBA

EL CONTENIDO ES SUFICIENTE PARA <N> PRUEBA

VER INSTRUCCIONES DE USO

VER INSTRUCCIONES DE USO

PRODUCTO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO

PRODUCTO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO

PROTEGER DE LUZ Y CALOR

PROTEGER DE LUZ Y CALOR

NO REUTILIZA

NO REUTILIZA

PRECAUCIÓN

PRECAUCIÓN

FABRICADO POR

FABRICADO POR

CONTROL

CONTROLAR

CONTROL POSITIVO

CONTROL POSITIVO

CONTROL NEGATIVO

CONTROL NEGATIVO

RIESGO BIOLÓGICO

RIESGO BIOLÓGICO

INFLAMABLE

INFLAMABLE

CORROSIVO

CORROSIVO

TÓXICO

TÓXICO

NO UTILICE SI EL EMBALAJE ESTÁ DAÑADA

NO UTILICE SI EL EMBALAJE ESTÁ DAÑADA

PRODUCTO ESTERILIZADO

PRODUCTO ESTERILIZADO

PELIGRO

PELIGRO

FUNCTION

Test for qualitative determination of antibodies against *Leishmania infantum* using canine 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* in dog serum or plasma. Antibodies against *Leishmania* present in the sample, bind to the recombinant k39 protein 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-dog 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 amount 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-dog 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. Contains: Non-reactive serum for leishmaniasis and preservative. **Potentially infectious.**

8- Positive Control - Store between 2 and 8°C. Contains: Reactive serum for leishmaniasis and preservative. **Potentially infectious.**

9- Plate Sealers

REAGENTS	Presentation		
	1	2	3
1- Sensitized Plate	1 unit (96 cavities)	2 units (192 cavities)	5 units (480 cavities)
2- Concentrated Conjugate (100x)	1 x 350 µL	2 x 350 µL	5 x 350 µL
3- Concentrated Wash Solution (20x)	1 x 50 mL	2 x 50 mL	5 x 50 mL
4- Diluent	1 x 60 mL	2 x 60 mL	5 x 60 mL
5- Substrate TMB	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL
6- Stop Solution	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL
7- Negative Control	1 x 1.0 mL	2 x 1.0 mL	5 x 1.0 mL
8- Positive Control	1 x 1.0 mL	2 x 1.0 mL	5 x 1.0 mL
9- Plate Sealers	3 unit	6 units	15 units

EQUIPMENT AND OPERATIONAL INPUTS

Materials contained in the kit:

- Reagents described in the previous table.
- Instructions for use (manual).

Materials needed, but not contained in the kit:

- 1- Set of calibrated pipettes, capable of dispensing volumes between 5 and 1000 µL, with a coefficient of variation of less than 1.5%.
- 2- Repeater or multichannel pipette calibrated at 100 µL volume, with a coefficient of variation of less than 1.5% (optional).
- 3- Microplate washing machine (optional).
- 4- ELISA reader with absorbance capacity at 450 and 630 nm wavelength.
- 5- Absorbent paper to dry the microcavities.
- 6- Stopwatch or clock.
- 7- Bottle to store the Washing Solution, after dilution.
- 8- Distilled or deionized water.
- 9- Quality Control Tools.

STORAGE AND TRANSPORT CONDITIONS

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

SPECIAL CARE

- 1- **Veterinary use only, for *in vitro* diagnostic.**
- 2- Strictly follow the methodology proposed to obtain accurate results.
- 3- The professional must strictly follow safety rules and routines when handling biological samples. The use of disposable gloves and other personal protective equipment is essential.
- 4- **IMPORTANT:** Before starting the test, allow all kit components to reach room temperature. Open the envelope containing the cavities only after reaching room temperature.
- 5- Do not mix reagents from different kits or lots. Do not use expired kit components.

- 6- Do not eat, drink, or smoke at the test site.
- 7- Do not pipette reagents or samples by mouth. Do not use the same tip to pipette different samples.
- 8- Positive and negative controls should be retested for each new test performed.
- 9- The Stop Solution contains Sulfuric Acid, which is a strong acid. Therefore, handle it with care.
- 10- Handle the kit components with care to avoid contamination. Take special care with the substrate, which is a light sensitive solution. Use new or appropriately clean tips and containers for handling and do not allow them to be exposed to strong light during storage or during the incubation periods of the assay.
- 11- Use contaminant-free freshly distilled or deionized water when preparing solutions.
- 12- Always add the reagents in the same order to minimize the difference in reaction time between the microcavities.
- 13- Before reading the plate, ensure that the bottom of the microcavities are clean and dry. Make sure there are no bubbles on the surface of the liquid.
- 14- We recommend applying the local, state and federal rules for environmental protection, so that disposal of reagents and biological material can be made in accordance with current legislation.
- 15- To obtain information related to biosafety or in case of accidents with the product, consult the MSDS (Material Safety Data Sheet) available on the website www.bioclin.com.br or upon request by the SAC (Customer Advisory Service) of Quibasa
- 16- Do not use the product in case of damaged packaging
- 17- It is essential that the instruments and equipment used are properly calibrated and subjected to periodic maintenance.

SAMPLES

Hemolysis, lipemia and bilirubin (jaundice) can interfere with the test result. The result obtained from samples under these conditions must be evaluated with caution.

Samples may be refrigerated at between 2 and 8°C for a maximum of 5 days.

If samples cannot be analyzed within 5 days, they can be stored for up to 30 days at -20°C (freezer)

Use serum or plasma (EDTA or Heparin).

PROCESS DESCRIPTION

Stability After Open

The results of the stability test show that the VETLISA LEISHMANIASIS IgG kit is stable after being opened for 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 AND SAMPLES

1- Washing Solution

Dilute the content of the Concentrated Wash Solution (Reagent N° 3) in 1000 mL of freshly distilled or deionized water. Store at 2 to 8°C until the validity date printed on the original bottle. If crystallization occurs, heat to 37°C until dissolution. It can be stored at room temperature.

2- Conjugate Solution

Dilute the Concentrated Conjugate (Reagent N° 2) in the ratio of 1:101 in Diluent (Reagent N° 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.

3- Sample Dilution

In a test tube, dilute 15 µL of the sample in 300 µL of Diluent (Reagent N° 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

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- Separate the cavities to be used considering: Controls and Samples ((it is recommended to test in duplicate).
- 2- Separate 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 minutes at room temperature.
- 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 three (3) 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 room temperature.
- 11- Repeat item 7.
- 12- Add 100 µL of Substrate TMB into each cavitie.
- 13- Homogenize gently for ± 3 seconds. Cover the cavities with plate sealer.
- 14- Incubate for 10 minutes at room temperature, protected from light.
- 15- Remove the plate sealer from the cavities.
- 16- Pipette 100 µL of Stop Solution into all cavities.
- 17- Homogenize gently for ± 3 seconds
- 18- Read the absorbance in an ELISA reader on a dual filter 450 nm (primary filter) / 630nm (secondary filter) within a maximum of 10 minutes after adding the Stop Solution.

TECHNIQUE VERIFICATION

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

ITEM	ABSORBANCE (DUAL FILTER)
Blank	< 0.050
Negative Control	< 0.450
Positive Control	> 1.000

If the values are out the expected ones, the test should be repeated.

CUT OFF CALCULATION

If the results of the controls are valid, calculate the cut off value with the following formula:

Cut Off = Negative Control Average Absorbance + 0.500

CALCULATION OF THE SAMPLE INDEX

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

ITEM	ABSORBANCE
Sample	1.093
Negative Control	0.201
Cut Off Value	0.201 + 0.500 = 0.701
Index: Sample Abs. / Cut Off Value	1.093 / 0.701 = 1.559

INTERPRETATION OF THE RESULT - QUALITATIVE

RESULTS	INDEX
Negative	< 0.9
Positive	> 1.1
Undetermined	≥ 0.9 e ≤ 1.1

IMPORTANT: Samples with indeterminate results must be retested. Samples that repeatedly show indeterminate results should be analyzed using an alternative method. If this sample shows a positive result, then it should be considered positive.

PROCEDURE LIMITATIONS

The interpretation of a diagnostic test should not be based on a single trial. Other confirmatory tests must be included before a sample is considered positive. A negative result does not exclude the possibility of exposure. However, all results should be interpreted in conjunction with vaccination history, available clinical and laboratory information.

INTERNAL QUALIT CONTROL

The Clinical Laboratory must have an internal quality control, where all procedures, rules, limits and tolerance to variations be clearly established. It is important to mention that all measurement systems present a analytical variety, and it must be monitor by the laboratory. Therefore, it is recommendable the use of controls, allowing the precision and accuracy of the dosages.

PRODUCT PERFORMANCE

PRECISION

Repeatability

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

Repeatability	Sample		
	1	2	3
Mean	1.794	1.029	0.040
Standard Deviation	0.053	0.035	0.003
Coefficient of Variation (%)	2.977	3.370	7.764

Reproducibility

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

Reproducibility	Sample		
	1	2	3
Mean	1.807	1.026	0.040
Standard Deviation	0.050	0.035	0.003
Coefficient of Variation (%)	2.760	3.422	6.895

CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

The VETLISA LEISHMANIASIS IgG analyzed clinical samples compared to other enzyme immunoassay methods. The results show that the clinical sensitivity of the product is > 99.9% and the clinical specificity is 96%.

METHOD		REFERENCE		Total
VETLISA LEISHMANIASIS IgG	Result	Positive	Negative	
	Positive	144	0	144
	Negative	6	150	156
Total Result		150	150	300

Clinical sensitivity: >99.9% (150/150) - IC 95%: 97.47 - 100%
Clinical specificity: 96% (144/150) - IC 95%: 91.82 - 98.58%
Precision: 98% [(144 + 150) / (150 + 150)]

CROSS REACTION

This product was tested with serum samples from animals diagnosed as negative for canine leishmaniasis and positive for the following diseases: ehrlichiosis, babesiosis, leptospirosis, anaplasmosis, distemper, parvovirus, and *Trypanosoma cruzi* infection. The product showed a negative result under all tested conditions.

REACTION WITH VACCINATED DOGS

This product was tested with serum samples from dogs vaccinated for Leishmaniasis, with a vaccine available on the market. The product was negative for all tested samples.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Leishmaniasis is an infectious and zoonotic disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, and transmitted by sandfly bites. The incubation period of Leishmaniasis can range from a few weeks to several years, and the main clinical manifestations are generalized lymphadenopathy, exfoliative dermatitis, progressive weight loss and keratoconjunctivitis. Due to the high frequency of asymptomatic cases, the diagnosis serology is an effective tool and indicated by the Ministry of Health. According to official bodies, the diagnosis of Leishmaniasis should consider screening the dog using immunochromatographic assays, followed by the confirmatory immunoenzymatic assay.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- 1- QUIBASA: Data from the Research and Development Department.
- 2- 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 infantun promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandfl ies. Parasite, 1994, 7, 311-318.
- 3- RIBEIRO VM. Leishmanioses. In: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais;
- 4- DENARDI AB, ROZA MR, organizadores. PROMOVET Pequenos Animais: Programa de Atualização em Medicina Veterinária: Ciclo 1. Porto Alegre: Artmed Panamericana; 2016.p.107- 50.
- 5- Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1ª ed. Brasília- DF, 2006.

QUALITY ASSURANCE

Before being released for consumption, all **Bioclin** 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 - Made in Brazil

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 02/08/2019 with the number 10.264/2019.

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

Review: April/2023



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