

Para o cálculo do *cut-off* deve-se calcular a média das densidades óticas (DO) dos controles negativos dentro da faixa de validação do teste. Caso seja encontrada alguma densidade ótica fora da faixa de validação do teste, esta deverá ser descartada e a média deverá ser realizada utilizando-se as demais densidades óticas, conforme demonstrado nos exemplos abaixo.

VALIDAÇÃO DO TESTE

Considerar o teste válido quando os valores da densidade ótica estiverem na faixa descrita a seguir:

Controle Positivo (LP): $\geq 0,500$ de DO

Controle Negativo (LN): $\geq 0,050 \leq 0,120$ de DO

Repetir o ensaio se os valores citados estiverem fora do limite.

Cálculo do *Cut-Off* (CO)

CO = XLN + Fator (0,150)

XLN = média da densidade ótica dos orifícios do controle negativo.

DO = Densidade ótica

LN = Controle Negativo

Exemplo 1:

DO LN 1 = 0,100 XLN = $\frac{DO LN1 + DO LN2 + DO LN3}{3} = \frac{0,100 + 0,098 + 0,101}{3} = 0,099$
 DO LN 2 = 0,098
 DO LN 3 = 0,101

CO = XLN + Fator (0,150)

CO = 0,099 + 0,150 = 0,249

Exemplo 2:

DO LN 1 = 0,110 XLN = $\frac{DO LN1 + DO LN2}{2} = \frac{0,110 + 0,090}{2} = 0,100$
 DO LN 2 = 0,090
 DO LN 3 = 0,131 → **Fora da faixa de validação do teste = descartar**

CO = XLN + Fator (0,150)

CO = 0,100 + 0,150 = 0,250

Exemplo 3:

DO LN 1 = 0,110 XLN = $\frac{DO LN1 + DO LN2}{2} = \frac{0,110 + 0,080}{2} = 0,095$
 DO LN 2 = 0,080
 DO LN 3 = 0,040 → **Fora da faixa de validação do teste = descartar**

CO = XLN + Fator (0,150)

CO = 0,095 + 0,150 = 0,245

Cálculo da Faixa Cinza (FC)

FC = CO x 1,2

Exemplo: CO = 0,322

FC = CO x 1,2

FC = 0,322 x 1,2

FC = 0,386

	CO	FC
AMOSTRAS NÃO REATIVAS	FAIXA CINZA (CO x 1,2)	AMOSTRAS REATIVAS

RESULTADOS:

Amostras reagentes: As que apresentarem densidade ótica superior a faixa cinza.

Amostras não reagentes: As que apresentarem densidade ótica inferior ao *Cut-Off*.

Amostras indeterminadas: As que apresentarem densidade ótica entre o *cut-off* e a faixa cinza.

Obs. 1: recomendamos a repetição das amostras que apresentarem densidade ótica na “faixa cinza”, considerada neste teste, entre o valor obtido para o *Cut-Off* e o valor obtido com a multiplicação deste pelo fator 1,2.

Obs. 2: mantendo-se as amostras na “faixa cinza” após a repetição, recomendamos a utilização de outras metodologias para confirmação deste resultado, que deverá ser designado como INDETERMINADO.

Obs.3: operador deverá observar os controles do teste, considerando que a DO obtida para o controle do conjugado (SS), não poderá ser $\geq 0,07$. Se este valor for superior a 0,07 significa presença de background no teste.

ÍNDICE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE:

Estudos preliminares de padronização do KIT EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA – Bio-Manguinhos, com apresentação a temperatura de 2 °C a 8 °C e de -20 °C foram realizados por Bio-Manguinhos em conjunto com o Instituto Adolfo Lutz (IAL-SP). Foram identificados 130 cães com suspeita clínica de

Leishmania Visceral Americana (LVA) dos quais foram coletadas amostras de soro. Estas amostras foram testadas tanto na IFI quanto no EIE. Para os cálculos de sensibilidade e especificidade a IFI foi considerado o teste padrão (“Gold Standard”), e os seguintes índices foram encontrados: Sensibilidade para amostras de soro dos cães: 94,54% e especificidade de 91,76%.

Melhoramentos do KIT EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA – Bio-Manguinhos foram realizados por Bio-Manguinhos, alterando sua conservação apenas a temperatura de 2 °C a 8 °C. A nova apresentação foi avaliada pelo Instituto Nacional de Infectologista Evandro Chagas (INI) que utilizou as 273 amostras testadas no kit atual, tendo uma reprodutibilidade de 100%.

ÍNDICE DE REPRODUTIBILIDADE, REPETITIVIDADE E ESTABILIDADE:

Diversos estudos foram realizados em nossos laboratórios utilizando amostras conhecidas e caracterizadas como padrão, sob os aspectos de reprodutibilidade e repetitividade. As conclusões nos permitiram determinar um período de 6 meses de validade para o produto, quando acondicionado conforme as recomendações do Manual de Instruções de Uso. Durante este período o produto manteve suas características e seus padrões de qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. ALVES, W.A. BEVILACQUA, P.D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da Leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad.S.Pub. RJ; 2004; 20(1)jan-fev: 259-265.*
2. ASFORD, D.A. BADARÓ, R. EULALIO, C. Et Al. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbant assay (FASTEIE) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Amer.J.Trop.Med.Hyg.1993;Jan;48(1):1-8.*
3. BADARÓ, R. DUARTE, M.I.S. Leishmaniose Visceral. In: VERONESI, R. FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia. 2ed. 2002; 1254-79*
4. BRADFORD, M.M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry. 1976; 72.*
5. BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Leishmaniose Visceral. Guia de Vigilância Epidemiológica. 2003; 527-539.
6. CARVALHO, F.A.A. CHAREST, H. TAVARES, C.A.P. Et Al. Diagnosis of American Visceral Leishmaniasis in human and dogs using the recombinant Leishmania donovan A2 antigen. *Diag. Microb. And Infect. Disease. 2002; 43: 289-295*
7. CUBA, C.A. MARS DEN, P.H.D. BARRETO, A. C. ROCHA, R. SAMPALIO, R.R. PATZIAFF, L. Diagnóstico parasitológico e imunológico de Leishmaniose tegumentar americana. *Biol. Of sanit. Param. 1980; 89: 95-208.*
8. MEDRONHO, R.A. Et Al. *Epidemiologia. 2003. Cap 18; p 259-270.*
9. MONTOYA, A. CASTELL, J.V. Long Term Storage of Peroxidase-Labeled Immunoglobulins for use in enzyme immunoassay. *J. Immun. Meth. 1978; 99: 13-20.*
10. MORENO, J. ALVAR, J. Canine Leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology. 2002; 18(9): 399-405.*
11. NAKANE, P.K. KAWAVI, A. Peroxidase Labeled Antibody a new Method of Conjugation. *J. Histochem Cytochem. 1974; 22(12); 1084-1091.*
12. PAPPAS, M.G. HAJKOSWSKI, R. HOCKMEYER, W.T. Dot enzyme linked immunosorbant assay (DOT-LISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Immunol. Method. 1983; Nov 11; 64(1-2): 205-14.*
13. REITHINGER, R. DAVIES, C.R. Canine Leishmaniasis: novel strategies for control. *Trends in Parasitology. 2002; 18(7): 289-290.*

Licenciado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob o nº 8.968/2004
 Resp.: Téc.: Daniel da Silva Guedes Junior- CRMV-RJ: 7242

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS:

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto a:

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/ Bio-Manguinhos | Fiocruz
 Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP: 21040-900 | Rio de Janeiro – RJ | CNPJ: 33.781.055/0015-30
 SAC: 08000.210.310 ou sac.reativos@bio.fiocruz.br | www.bio.fiocruz.br
 Indústria Brasileira

PROIBIDA VENDA AO COMÉRCIO.

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA MODELO DE PROTOCOLO

Produto: Partida nº: Vencimento:/...../.....

Seção: EIE nº: Data:/...../.....

Início:h min Término:h min

Disposição das Amostras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Densidade Ótica das Amostras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Cálculo do *Cut-Off* (CO)

CO = XLN + 0,150

XLN = média da densidade ótica dos orifícios do controle negativo.

X = médias das DO.

DO = Densidade ótica.

LN = Controle Negativo.

CO = $\frac{DO LN1 + DO LN 2 + DO LN 3}{3} = \frac{XLN}{3} = X$

CO = X + 0,150 =

Técnico Responsável:.....

Observações:.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....



EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Bio-Manguinhos

(Uso Veterinário)

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (EIE) PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

(material fornecido para 384 reações)

INDICAÇÃO DE USO

O Kit EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA Bio-Manguinhos é utilizado na detecção de anticorpos contra *Leishmania major like*, em soros ou plasmas de cães.

PRINCÍPIO DO TESTE

O ensaio imunoenzimático consiste na reação de anticorpos presentes nos soros ou plasmas de cães com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania major like* obtidos a partir de cultura *in vitro*. Os antígenos obtidos são previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas/ "strips" (fase sólida). A seguir, adicionam-se os soros controle positivo, negativo e as amostras, devidamente diluídos. Caso as amostras possuam anticorpos específicos, estes irão se ligar aos antígenos da fase sólida.

Na etapa seguinte, deve-se adicionar um conjugado específico, anti imunoglobulina G, marcado com a enzima peroxidase. Na presença de anticorpos específicos, ocorrerá a ligação conjugado-anticorpo, que poderá ser evidenciada com a adição de uma substância cromógena (tetrametilbenzidina-TMB).

A peroxidase juntamente com o peróxido de hidrogênio formará um composto de coloração azul turquesa que ao adicionar-se o ácido sulfúrico, interrompe a reação e passa a apresentar uma coloração amarela, positivo (reagente). Nas cavidades que não houver anticorpos específicos, não haverá desenvolvimento de cor o que caracteriza uma reação negativa (não reagente). Os resultados podem ser avaliados por meio de um espectrofotômetro para microplaca em comprimento de onda de 450 nm.

ESQUEMA DO TESTE

Reagente



Não Reagente



MATERIAL FORNECIDO

Diluyente Amostras/ Conjugado [2X] 3 frascos com 50 mL
Tampão de lavagem [20X]..... 2 frascos com 60 mL
Solução Reveladora..... 2 frascos com 25 mL
Ácido Sulfúrico 2M 1 frasco com 30 mL
Controle Positivo 1 frasco com 0,25 mL
Controle Negativo..... 1 frasco com 0,25 mL
Conjugado..... 1 frasco com 0,5 mL
Molduras com 6 "strips" dupla sensibilizadas..... 4 molduras
Manual de Instrução de Uso..... 1 unidade

MATERIAL COMPLEMENTAR NÃO FORNECIDO:

- Água destilada;
- Vidraria básica em geral (tubos, pipetas, provetas, etc);
- Micropipetadores multicanal e monocal ajustáveis e ponteiros descartáveis;
- Luvas descartáveis;
- Barquetes ou reservatórios;
- Estufa a 37 °C (±1 °C);
- Sistema de vácuo com pente de lavagem, pipeta Pasteur adaptada ou lavador automático de microplacas;
- Tampas para as placas;
- Hipoclorito de sódio a 2,5% ou água sanitária;
- Espectrofotômetro para leitura de microplacas, equipado com filtro de 450 nm;

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DOS COMPONENTES:

Manter todos os reagentes entre 2 °C a 8 °C

Todos os componentes do kit devem ser conservados em temperatura entre 2 °C a 8 °C desde o ato do recebimento até a validade definida na caixa principal do kit.

Obs.: De acordo com estudos realizados em Bio-Manguinhos, a temperatura de transporte, com bobinas de gelo reciclável, permite que o conjunto se mantenha em condições estáveis durante 24 a 36 horas.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Somente para uso Diagnóstico "in vitro".

Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos, podendo representar uma fonte de infecção e contaminação. Portanto, ao manusear qualquer um dos reagentes desse conjunto, observe as precauções de biossegurança necessárias.

A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende do cumprimento às boas práticas laboratoriais, tais como:

- As amostras e os controles devem ser manipulados com cuidado;
- Homogeneizar as amostras e controles antes de usar;
- Utilizar equipamento de proteção individual (EPI), tais como luvas descartáveis, jaleco e protetor facial, em todas as etapas do teste.
- Desprezar ponteiros, luvas, pipetas de vidro, frascos, placas utilizadas, etc., em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% , água sanitária ou lixo de risco biológico;
- Nunca misturar componentes de partidas diferentes;
- Só utilizar componentes do mesmo conjunto.
- Para evitar interferências, nunca tocar com os dedos na parte de interna dos strips;
- Cada strip só pode ser utilizada uma única vez;
- A solução reveladora e o conjugado são irritantes para pele e mucosas e não devem entrar em contato com metais;
- Não usar os componentes após sua data de vencimento;
- Utilizar frascos e vidrarias rigorosamente limpos, pois resíduos de detergentes e/ou substâncias oxidantes poderão interferir na reação.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Os componentes do kit armazenados na temperatura de 2 °C a 8 °C, devem ser retirados de sua temperatura de conservação antes do início do teste e utilizados, retornando-os à temperatura logo após o uso. Com exceção do conjugado, que deve ser retirado de sua temperatura de conservação apenas no momento de sua utilização, retornando para a conservação imediatamente, após seu uso.

Importante: - Retirar apenas a quantidade de "Strips" a serem utilizadas no teste.

- O conjugado não tolera variações de temperatura, evitar prolongar sua permanência fora da temperatura de 2 °C a 8 °C.

1- Preparo do diluente de amostras/conjugado:

Obs.: O diluente é sujeito a precipitação, podendo ser assim utilizado.

Nº Strips duplas	Nº de reações	Diluyente Amostras/ Conjugado [2X]	H ₂ O destilada
01	Até 16	6 mL	6 mL
02	Até 32	12 mL	12 mL
03	Até 48	15,5 mL	15,5 mL
04	Até 64	21,5 mL	21,5 mL
05	Até 80	25,5 mL	25,5 mL
06	Até 96	30,5 mL	30,5 mL

2- Diluir em tubos, 5 µL dos controles e das amostras de soros ou plasmas de cães a serem analisadas, previamente homogeneizadas, em 500 µL do diluente de amostras/conjugado (1:100).

3- Distribuir na placa sensibilizada, 100 µL dos controles e amostras já diluídos, da seguinte forma: na coluna 1 fileiras "A" o controle positivo; na "B", "C" e "D" o controle negativo; "E" sem soro (controle do conjugado - SS). Nos demais orifícios, distribuir 100 µL das amostras testes, já diluídas nos orifícios correspondentes (seguir protocolo).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LP	A04	A12	A20	A28	A36	A44	A52	A60	A68	A76	A84
B	LN	A05	A13	A21	A29	A37	A45	A53	A61	A69	A77	A85
C	LN	A06	A14	A22	A30	A38	A46	A54	A62	A70	A78	A86
D	LN	A07	A15	A23	A31	A39	A47	A55	A63	A71	A79	A87
E	SS	A08	A16	A24	A32	A40	A48	A56	A64	A72	A80	A88
F	A01	A09	A17	A25	A33	A41	A49	A57	A65	A73	A81	A89
G	A02	A10	A18	A26	A34	A42	A50	A58	A66	A74	A82	A90
H	A03	A11	A19	A27	A35	A43	A51	A59	A67	A75	A83	A91

LP = Controle Positivo LN = Controle Negativo SS = Sem soro A = Amostra

4- Tampar as placas e incubar a 37 °C ± 1 °C por 30 min.

Obs.: Caso ocorra variação significativa de temperatura durante o período de incubação, o técnico deverá invalidar o ensaio.

5- Preparo do tampão de lavagem:

Obs.: este tampão é sujeito a cristalização, caso isso ocorra, coloque em banho-maria a 37 °C ± 1 °C até a total dissolução dos cristais.

a) volumes necessários quando se utiliza sistema de vácuo com pente de lavagem ou pipeta Pasteur:

Nº Strips duplas	Nº de reações	Tampão de lavagem [20X]	H ₂ O destilada
01	Até 16	2,5 mL	47,5 mL
02	Até 32	4,5 mL	85,5 mL
03	Até 48	6,5 mL	123,5 mL
04	Até 64	8,5 mL	161,5 mL
05	Até 80	10,5 mL	199,5 mL
06	Até 96	12,5 mL	237,5 mL

b) volumes necessários quando se utiliza lavadores automáticos:

Nº Strips duplas	Nº de placas	Tampão de lavagem [20X]	H ₂ O destilada
Até 3	1/2	20 mL	380 mL
Até 6	1	25 mL	475 mL
Até 9	1 1/2	30 mL	570 mL
Até 12	2	35 mL	665 mL
Até 15	2 1/2	40 mL	760 mL
Até 18	3	45 mL	855 mL
Até 21	3 1/2	50 mL	950 mL
Até 24	4	55 mL	1045 mL

6- Destampar cuidadosamente a placa, aspirar o conteúdo e lavar 5 vezes com tampão de lavagem (250 µL/orifício). Aguardar 30 a 60 segundos entre cada lavagem.

7- Diluir o conjugado no diluente de amostras/conjugado, preparado anteriormente.

Preparo do conjugado:

Nº Strips duplas	Nº de reações	Diluyente Amostras/ Conjugado Diluído	Conjugado
01	Até 16	2 mL	20 µL
02	Até 32	4 mL	40 µL
03	Até 48	5 mL	50 µL
04	Até 64	7 mL	70 µL
05	Até 80	9 mL	90 µL
06	Até 96	11 mL	110 µL

8- Homogeneizar bem e distribuir 100 µL da diluição do conjugado em cada orifício das strips.

9- Tampar as placas e incubar a 37 °C ± 1 °C por 30 min. Aspirar e lavar conforme descrito no item 6.

10- Retirar do frasco de solução reveladora somente a quantidade que será utilizada no teste conforme a tabela:

11- Volume de solução reveladora

Nº Strips duplas	Nº de reações	Solução Reveladora
01	Até 16	2,0 mL
02	Até 32	4 mL
03	Até 48	5 mL
04	Até 64	7 mL
05	Até 80	9 mL
06	Até 96	11 mL

12- Distribuir 100 µL da solução reveladora rapidamente em todos os orifícios.

13- Incubar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 10min.

14- Bloquear a reação adicionando 50 µL de ácido sulfúrico 2M em todos os orifícios. Em seguida, proceder a leitura das microplacas.

LEITURA

Ligar o espectrofotômetro para microplacas, equipado com filtro de 450 nm para leitura e sem a utilização de filtro de referência (620-630 nm).

Obs.: Caso a leitura seja feita com filtro de 450 nm, tendo como referência outro de 620-630 nm, todas as densidades óticas (DO) ficarão abaixo do esperado, prejudicando o cálculo do *cut-off* e causando a ocorrência de resultados falso-positivos no ensaio.