

Critérios de Validação

As Densidades Ópticas (D.O.) dos controles **não reagentes** devem ser sempre inferiores a **0,100**. E as D.Os do controles **reagentes** devem ser sempre superiores a **0,300**.

Cálculo do Ponto de Corte

Calcular a média aritmética das D.Os. do soros não reagentes e somar ao fator **R = 0,142**. Para determinação da amplitude da zona cinza (faixa de indeterminados) subtrair do ponto de corte **0,03**.

Socorro Técnico

Em caso de dúvidas entrar em contato com o suporte no telefone (81) 8888.9072 ou por e-mail servio@biogene.ind.br.

Resp. Téc. Ana Cláudia Campos
Médica Veterinária CRMV - PE - 3201

Produzido e Fabricador por:

Biogene Indústria e Comércio Ltda ME

Rua Costa Sepúlveda, 749

Engenho do Meio - Recife - PE

CEP 50.730-260

CGC.: 69.951.234/0001-10

Insc. Est. : 18.2.001.0198256-0

Fone/Fax: 81 - 3453.2502 ou 8888.9072

E-mail: servio@biogene.ind.br

MAPA Licença n°. 7434/2000

Indústria Brasileira



Validade e data de fabricação na embalagem



Kit para Diagnóstico do Calazar Canino ELISA/S7®

Para uso veterinário

Descrição

A reação de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) é baseada no reconhecimento de anticorpos específicos por antígenos fixados em um suporte plástico. Este reconhecimento é revelado através de uma proteína conjugada a uma enzima (Peroxidase) permitindo a visualização da reação.

O **ELISA/S7®** tem como base um peptídeo recombinante, produzido por engenharia genética, que permite a detecção de anticorpos na fase mais precoce da infecção. O emprego desse antígeno no kit para o diagnóstico do calazar canino - **ELISA/S7®** confere alta especificidade e sensibilidade ao teste, sendo único no mercado.

Apresentação

O kit é composto de uma placa de ELISA e de todos os reagentes necessários à realização de 96 reações.

Produto	Volume	Conservação
Solução de coleta	25 ml	- 20°C
Solução S7	10 ml	- 20°C
Soro controle reagente	10 µl	- 20°C
Soro controle não reagente	10 µl	- 20°C
Solução Citrato	10 ml	4°C
Conjugado (Ptn - A PO)	3 µl	4°C
Revelador (TMB)	100 µl	4°C
Água Oxigenada (H ₂ O ₂)	50 µl	4°C
Solução de lavagem (PBS 10x)	50 ml	4°C
Tween 20	200 µl	4°C
Solução de parada (H ₂ SO ₄ - 2N)	10 ml	T.A

A estabilidade de todos os reagentes é de seis meses

Observações

- a) Usar sempre luvas
- b) As lavagens devem ser feitas utilizando-se picetas, dirigindo-se o jato de tampão diretamente no fundo do poço.
- c) As soluções devem ser desprezadas invertendo-se a placa de uma só vez.
- d) Pode haver formação de cristais na Solução de Lavagem 10x. Neste caso é só proceder uma pequena agitação.
- e) É necessário um segundo soro controle não reagente (não fornecido no kit), para o cálculo do ponto de corte.

Procedimentos

1. Preparo dos tampões de lavagem

- a) O tampão de lavagem PBS está concentrado 10X. Diluir uma parte de PBS em nove partes de água destilada.
- b) Para o PBST é só acrescentar em uma parte do PBS 0,05% de Tween 20 (ex: para 400ml de PBS acrescentar 200µl de Tween).

2. Sensibilização e neutralização da placa

- a) Distribuir 100 µl por poço da solução S7 na placa.
- b) Incubar *overnight* à 4°C (geladeira) ou 4 horas em T.A.
- c) No dia seguinte desprezar a solução S7.
- d) Lavar 3 vezes com tampão PBST.
- e) Distribuir 100 µl por poço de uma solução composta de PBST + 2% de leite em pó desnatado.
- f) Incubar por 30 minutos a T.A.
- g) Após incubação desprezar a solução e lavar a placa duas vezes com PBST.

A placa sensibilizada e neutralizada pode ser utilizada imediatamente ou ser embalada seca em papel alumínio e estocada no freezer (- 20°C) por períodos de até 2 meses sem perda de suas características. No momento do uso deixar a placa descongelar por pelo menos 15 minutos a T.A.

3. Diluição dos soros

Os soros controles e amostras em testes devem ser diluídos em solução de coleta (1:100) e incubados por pelo menos 4 horas a T.A. ou 12 horas na geladeira (4°C).

O título da reação é de 1:100.

4. Realização dos testes

- a) Lavar a placa uma vez com tampão PBST.
- b) No primeiro poço (A1) colocar 100µl de PBST. Este é o branco para o leitor de ELISA (indispensável em alguns equipamentos).
- c) Distribuir 100µl de cada um dos soros controles, previamente diluídos, nos poços: B1 e D1 não reagente e C1 reagente.
- d) Distribuir 100µl por poço dos soros em teste, previamente diluídos.
- e) Incubar por 30 minutos a T.A.
- f) Lavar a placa 3 vezes com PBST.
- g) Distribuir 100µl por poço da solução do conjugado (Proteína - A PO). Esta solução deve ser preparada na hora diluindo 1µl do conjugado em 10ml de PBST. Descarte a sobra desta solução.
- h) Incubar por 30 minutos a T.A.
- i) Lavar a placa 3 vezes com PBS (sem o Tween 20).
- j) Distribuir 100µl por poço da solução de revelação. Esta solução também deve ser preparada na hora acrescentando em 10ml de Tampão Citrato 100µl de TMB e 50µl de Água Oxigenada.
- k) Incubar a placa por 20 minutos no escuro (ex.: dentro de uma gaveta).
- l) Acrescentar duas gotas da solução de parada.
- m) Efetuar a leitura em leitor de ELISA a $\lambda = 450 \text{ nm}$.

- O ELISA/S7[®] também pode ser executado com amostras de sangue. Neste caso 250µl da solução de coleta deve ser distribuído em um tubo *ependorff* e apenas 2 gotas de sangue (~30 µl) acrescentadas nesta solução.

- Nesta solução o sangue pode ser conservado por até 5 dias na geladeira (NÃO CONGELAR).

- As amostras de sangue podem ser centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos para que o coágulo seja totalmente separado da solução.

- Em caso de hemólise acentuada, após a centrifugação o sobrenadante deve ser transferido para um novo tubo e incubado por 20 minutos a 56°C (neutralização).

- O sobrenadante do tubo pode ser aplicado diretamente na placa para realização do teste. Neste caso, deve-se respeitar o período de incubação de pelo menos 4 horas em contato com a solução de coleta. A diluição deve ser feita acrescentando-se 25µl deste sobrenadante em 75µl de PBST (previamente colocado no poço).