

Desempenho do teste

Com base em estudos realizados em parceria com as universidades UFPE, UFCG e UFRN, o kit **ELISA/S7**[®] apresentou especificidade média de 94,3% podendo alcançar 100%, enquanto que a sensibilidade média foi de 89% podendo alcançar 96,4%.

O Kit ELISA/S7[®] e as vacinas contra o calazar canino

Por ter como base um peptídeo recombinante, o **Kit ELISA/S7**[®] não reage cruzadamente com os anticorpos vacinais gerados pelas vacinas atualmente disponíveis no mercado nacional⁽⁵⁾. Sendo assim, testes realizados com soro de cães vacinados continuam dando resultados negativos. A positividade só ocorre se o animal estiver realmente infectado.

Referências

- 1- Andrade, C.R. e Andrade, P.P. (1995) - Recombinant *Leishmania* proteins in the diagnosis of human kala-azar. In "Research and Control of Leishmaniasis in Brazil", edit. S. Brandão Fo., FOC/CpqAm, Recife, 217 – 227.
- 2 - Andrade, P.P. e Andrade, C.R. (1995) - Heat shock proteins in visceral leishmaniasis. In "Stress Proteins in Medicine", edit. W. van Eden, Marcel Dekker Publish. Co., N. Y., EUA, 1985, pgs 308-326
- 3 - Andrade, P.P., Santos, E.S.C., Kido, E.A., Queiroz, I.M., Luna, L.K.S., Torquato, G.N., Balbino, V.Q. (1998) - Assessment of a recombinant *Leishmania* HSP70 ELISA for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. In "Memórias do Instituto Oswaldo Cruz". Vol. 93, Suppl II, 217.
- 4 - Queiroz, I.M., Santos, E.S.C, Andrade, P.P. (1997) - Aumento e Estabilidade da Expressão de Proteínas Recombinantes de *L. chagasi* e *T. cruzi* para fins de Produção Industrial em Vetores Plasmidiais. Brazilian Journal of Genetics. Vol. 20 Suppl. III, 194.
- 5- Santos, E.S.C., Andrade, P.P., Menz, I., Queiroz, I.M. (2007) - Discriminação sorológica entre animais infectados e vacinados pela vacina Leishmune[®] com o kit ELISA/S7 - Biogene[®]. Revista de Patologia Tropical, v 36, suplemento 2.

Socorro Técnico

Em caso de dúvidas, entrar em contato com o suporte no telefone (81) 3048-1884/ (81) 8888-9072 ou por e-mail servio@biogene.ind.br.

Resp. Téc. Salomé Gonçalves Simões
Médica Veterinária CRMV - PE – 3708/VP

Produzido e Fabricado por:

Biogene Indústria e Comércio Ltda ME

Rua Lindolfo Collor, 390 Engenho do Meio - Recife – PE
CEP 50.730-605

CNPJ: 69.951.234/0001-10 Insc. Est.: 0198256-76

Fone/Fax: 81 - 3048-1884 ou 8888-9072

E-mail: servio@biogene.ind.br

MAPA Licença nº. 7434/2000

Indústria Brasileira

Validade e data de fabricação na embalagem



Kit para Diagnóstico do Calazar Canino ELISA/S7[®]

Para uso veterinário

A **Biogene** é uma empresa de base biotecnológica. Seu principal objetivo é o desenvolvimento e a industrialização de produtos diagnósticos veterinários.

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 (1,2,3 e 4).

Apresentação

O kit é composto de cinco placas de ELISA prontas para o teste e de todos os reagentes necessários a realização de 480 reações.

Produto	Volume
Solução de Lavagem (PBS 10x)	100 ml
Solução de Lavagem (PBST 10x)	100 ml
Solução de Diluição	80 ml
Solução Citrato	60 ml
Solução de Parada (H ₂ SO ₄ – 2N)	50 ml
Revelador (TMB)	700 µl
Água Oxigenada (H ₂ O ₂)	400 µl
Soro Controle não Reagente (1:10)	100 µl
Soro Controle Reagente (1:10)	100 µl
Conjugado (PtnA - PO)	15 µl

O Kit **ELISA/S7**[®] pode ser transportado à temperatura ambiente, por até 10 dias, sem comprometimento da estabilidade de seus componentes. Todos os reagentes são estáveis desde que mantidos em geladeira (4°C) até o período de vencimento indicado na embalagem.

Atenção

- Usar EPIs durante todas as etapas de execução do teste.
- Não utilizar nenhuma solução gelada. As Soluções de Lavagem podem apresentar formação de cristais, que dissolvem facilmente no momento da diluição.
- As Soluções de Lavagem PBST e PBS estão 10x concentradas e deverão ser previamente diluídas em água destilada (completar cada volume para um litro). Verificar o pH 7,4 se necessário ajustar com NaOH.
- Nas lavagens manuais com pissetas, o jato de tampão deve ser forte e dirigido diretamente ao fundo do poço. Na lavagem com PBST ocorre a formação de bolhas: recomendamos uma 4ª lavagem só com PBS. As soluções devem ser desprezadas da placa invertendo-a de uma só vez.
- A diluição do conjugado e o preparo da solução reveladora só deverão ser feitos no momento do uso.
- Considerando que ocorrem perdas durante a pipetagem devem ser preparados volumes um pouco acima do mínimo necessário.
- Se a placa não for toda utilizada, as tiras restantes devem ser guardadas em sua embalagem original vedada e mantidas em geladeira.

Procedimentos

1. Diluição dos soros

O volume de solução por poço é de 100µl. A diluição padrão da reação é de 1:100.

Os soros em teste devem ser diluídos em Solução de Diluição e incubados por pelo menos 2 horas a temperatura ambiente ou 12 horas na geladeira (4°C). Os soros hemolisados devem ser neutralizados (incubados por 20 minutos a 56°C) antes da diluição.

a) Soros teste

As amostras podem ser diluídas a 1:100 (1µl do soro em 100µl da Solução de Diluição) ou alternativamente 1:10 (5µl do soro em 45µl da Solução de Diluição) e logo após 1:10 (10µl da primeira diluição em 90µl de Solução de Diluição).

b) Soros controles

Os soros controles pré-diluídos 1:10 devem ser diluídos mais 10x no momento do uso.

	Soro	Sol. de diluição	Volume final
Soro controle	10µl	90µl	100µl

2. Realização dos testes

- No primeiro poço (A1) colocar 100µl de PBST. Este é o branco para o leitor de ELISA.
- Distribuir 100µl de cada um dos soros controles, previamente diluídos, nos poços: B1 e D1 não reagente e C1 reagente.
- Distribuir 100µl por poço dos soros em teste, previamente diluídos.
- Incubar por 30 minutos a T.A.
- Lavar a placa 3 vezes com PBST (veja tópico: Atenção c, d, e).
- Distribuir 100µl por poço da solução do conjugado (PtNa - PO). Esta solução deve ser preparada na hora, diluindo 1µl do conjugado em 10ml de PBST (1:10.000). Descarte a sobra desta solução.
- Incubar por 30 minutos a T.A.
- Lavar a placa 3 vezes com **PBS**.
- Preparar a solução de revelação conforme o quadro abaixo e distribuir 100µl por poço.

	Sol. Citrato	TMB	Água Oxigenada
1 tirinha	1ml	10µl	5µl
½ placa	5ml	50µl	25µl
1 placa	10ml	100µl	50µl

Esta solução deve ser preparada no momento do uso.

- Incubar a placa por 20 minutos no escuro (ex.: dentro de uma gaveta).
- Acrescentar duas gotas ou 100µl por poço da Solução de Parada.
- Secar e limpar bem o fundo da placa antes da leitura.
- Efetuar a leitura em leitor de ELISA a $\lambda = 450 \text{ nm}$.

Critérios de Validação

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

Cálculo do Ponto de Corte

Calcular a média aritmética das D.Os. dos soros controles 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**.