



Kit para Detecção Molecular de *Babesia canis*

Somente para diagnóstico veterinário *in vitro*
Manual do usuário.

FINALIDADE

O kit de detecção molecular de *Babesia canis* PCRRun® tem a finalidade de detectar a presença do DNA de *Babesia canis canis* e *Babesia canis vogeli* em sangue total de cães. O kit contém todos os componentes requeridos para executar o teste de forma rápida e simples

PRINCÍPIO

O PCRRun® é um método de ensaio molecular baseado na amplificação isothermal de parte do gene rDNA 18S. É usado para detecção qualitativa de *B. canis* e *B. vogeli*. Esse kit foi desenvolvido especialmente para utilizar com o PCRRun® Reader.

ESTOCAGEM E ARMAZENAMENTO

- Conservar entre 2-25 °C (temperatura ambiente ou refrigerado).
- Evitar exposição direta de luz solar.
- Não utilizar após a validade informada no rótulo.
- Não congelar.
- Não submeter a altas temperaturas
- Precauções:**
- Para evitar a contaminação do DNA na reação, sempre utilize luvas descartáveis durante a realização do teste.
- Abra e remova os tubos de reação PCRRun® das embalagens seladas de alumínio somente na hora do procedimento.
- Retorne os tubos de reação PCRRun® não utilizados para o pacote de alumínio original juntamente com o dessecante. Selar com fita adesiva.**
- Não utilize o kit se o pacote ou os componentes estiverem danificados.
- Cada componente neste kit é adequado para uso apenas com o número do lote específico. Os componentes foram homologados no controle de qualidade como unidade de lote padrão. Não misture os componentes de lotes diferentes.
- Utilizar procedimentos sanitários do Brasil destinados a resíduos biológicos e moleculares no manuseio e descarte de componentes do kit.
- Realizar a extração de DNA em uma área separada da área utilizada para a reação PCRRun®

INFORMAÇÕES

A babesiose canina é uma doença de ocorrência mundial causada por um protozoário hemoparasita do gênero *Babesia* transmitido ao animal por meio da picada de carrapatos. Duas espécies conhecidas por infectarem os cães são a *B. canis* e *B. gibsoni*. *B. canis* tem sido diferenciada em três subespécies (*B. canis canis*, *B. canis vogeli* e *B. canis rossi*) baseadas em imunidade cruzada, testes sorológicos, especificidade do vetor e análise filogenética. A infecção é mais prevalente em estações e regiões com alta prevalência de carrapatos e outros vetores artrópodes. A transmissão também pode ocorrer por transfusão sanguínea ou fômites. Brigas entre cães também podem ser consideradas um meio de transmissão mecânico.

O período de incubação dura em média 2 semanas. Os sinais e sintomas podem se caracterizar por letargia, anorexia, fraqueza, febre, mucosa oral pálida, urina avermelhada ou alaranjada, fezes

claras e linfonodos aumentados. A replicação intracelular do agente resulta em destruição do eritrócito e liberação de hemoglobina resultando em anemia e icterícia. Uma infecção severa pode afetar múltiplos órgãos incluindo os pulmões, trato gastrointestinal, rins, e sistema nervoso. A severidade dos sintomas depende da espécie de *Babesia* envolvida e do sistema imune do hospedeiro. Cães que se recuperam da doença frequentemente possuem infecções subclínicas e podem sofrer reincidência bem como tornarem-se fontes de infecção para a manutenção e transmissão da babesiose.

DIAGNÓSTICO

A babesiose é tipicamente diagnosticada na fase aguda pela identificação do agente em coloração de Wright ou Giemsa no esfregaço sanguíneo. O diagnóstico em cães com infecção crônica ou subclínica é difícil devido ao baixo nível de babesias no sangue dos animais. A imunofluorescência indireta e o teste de ELISA podem determinar a presença da doença pela detecção de anticorpos, porém podem requerer até 10 dias para se chegar ao limite de detecção. Embora o animal apresente cura clínica, as infecções por *Babesia* são frequentemente persistentes em cães. Mesmo após o tratamento apropriado, a infecção pode estar presente durante toda a vida do paciente.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma alternativa que oferece alta sensibilidade no diagnóstico durante a infecção ativa e pode detectar a doença antes da soroconversão. Além disso, a PCR pode também detectar infecções persistentes que podem durar até 27 meses.

CONTEÚDO DO KIT

Componentes	Conteúdo	Quantidade
Embalagem de alumínio	8 tubos com <i>Babesia</i> e outros componentes liofilizados	2
Tampão PCRRun®	Tampão PCRRun® para dissolver o liofilizado do tubo	2 tubos, 200 µL
Controle Positivo PCRRun®	Parvovírus liofilizado	1 tubo

EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS:

- Pipetas com barreira para aerossol;
- Água ultra pura;**
- Kit de extração de DNA compatível com kit PCRRun®;
- PCRRun® Reader (fornecido pela Biogal);
- Cronômetro;
- Tesoura;
- Caneta marcadora permanente de ponta fina;
- Luvas de proteção.

COLETA DE AMOSTRA, ESTOCAGEM E TRANSPORTE

Este kit é apropriado para a detecção de ácidos nucleicos extraídos de sangue total empregando os kits de extração desenvolvidos para PCR. Amostras de sangue podem ser coletadas em EDTA, heparina ou citrato de sódio. Anticoagulantes possuem uma substancial consequência em reações de PCR e por essa razão é necessário que o volume de sangue seja corretamente colhido de acordo com as instruções contidas no tubo.

Para melhores resultados, use sempre amostras frescas e DNA recém-extraído. Se não for possível, as amostras e o DNA podem ser mantidos de 2 a 8°C por até 24 horas ou -20°C por um período de tempo maior.

PROTÓCOLO - REAÇÃO PCR[®]

1. Limpar a área de trabalho para o ensaio. A área de trabalho deve ser limpa com solução de hipoclorito a 3,5%, diluído com água numa proporção de 1:10.

2. Material para o ensaio:

- ✓ DNA extraído;
- ✓ Embalagem com tubos de reação;
- ✓ Tampão PCR[®];
- ✓ Pipeta de 5 µL;
- ✓ Pipeta de 15 µL;
- ✓ Controle Positivo PCR[®];
- ✓ Marcador permanente de ponta fina;
- ✓ PCR[®] Reader (Utilizar o manual de instruções PCR[®] Reader para executar o procedimento).

3. Controle Positivo

Um controle positivo é fornecido com o kit. Recomenda-se que esse controle seja preparado ao mesmo tempo da preparação das amostras a serem testadas.

A concentração final da solução será de 10⁵ cópias/5µL.

- a. Adicione 500 µL de água de grau molecular (água ultra pura, própria para reações de biologia molecular) ao frasco contendo o *pellet* liofilizado. Agite em vórtex e deixe repousar por 5 minutos em temperatura ambiente. Agite em vórtex novamente. O frasco contém 10⁶ cópias do gene alvo/5µL. Rotule o frasco. Esta é a solução de estoque.
- b. Prepare um tubo contendo 45µL de água de grau molecular (água ultra pura).
- c. Adicione 5µL da solução de estoque (preparada no item "a") nesse tubo resultando em uma concentração final de 10⁵ cópias/5µL e agite em vórtex. Essa diluição será empregada como controle positivo.
- d. Use 5µL do controle positivo para as reações PCR[®] da mesma forma como é realizado com DNA de amostras a serem testadas. O restante da solução de estoque dele ser distribuído em pequenos volumes e mantido a -20°C para serem usados posteriormente.

O controle positivo pode ser uma fonte de contaminação. Por isso pede-se o máximo de atenção e cuidado para que o mesmo não tenha contato com outros componentes do kit. O controle positivo deve ser adicionado ao tubo de reação e seguir com as demais complementações realizadas para amostras a serem testadas.

4. Ligue o PCR[®] Reader e siga as instruções do manual do equipamento.

5. Remova os tubos PCR[®] da embalagem de alumínio. Tenha cuidado para retornar os tubos que não foram usados para o envelope selando-o para manter um ambiente seco. Oito tubos de reação estão conectados por uma pequena tira de plástico. Com uma pequena tesoura, desconecte o número de tubos desejados sem prejudicar as tampas. Bata o tubo verticalmente e suavemente

sobre uma superfície plana e firme para que todo o conteúdo desça ao fundo do tubo. A pequena pastilha branca deve estar localizada na parte inferior do tubo.

6. Identifique os tubos com o número de cada amostra.

7. Cuidadosamente, adicione 15 µL do tampão PCR[®] no tubo de reação (fazer um por vez). Feche a tampa e incubar a mistura à temperatura ambiente por 1 minuto para permitir que o *pellet* se dissolva completamente.

8. Adicione 5 µL da amostra de DNA dentro do tubo PCR[®] e misture rigorosamente. Feche a tampa do tubo firmemente e bata suavemente o tubo em uma superfície para trazer todo o fluido para o fundo do tubo.

9. Coloque o tubo de reação no PCR[®] Reader pré aquecido e siga as instruções do manual do equipamento.

ANÁLISE DA REAÇÃO PCR[®]

Após aproximadamente 1 hora de incubação, os resultados de cada reação irão aparecer na tela do equipamento. Siga as instruções encontradas no manual que acompanha o PCR[®] Reader.

LIMITAÇÕES

Como qualquer teste de diagnóstico, o resultado do PCR[®] deve ser interpretado tendo em conta todos os dados clínicos e laboratoriais.

Animais submetidos a tratamento contra babesiose podem apresentar-se negativos ao teste.

SENSIBILIDADE

A reação PCR[®] pode detectar um mínimo de 10² cópias do gene alvo em DNA purificado.

REFERÊNCIAS

1. Babesia – A historical overview, Gerrit Uilenberg. *Veterinary Parasitology*, 138 (2006) 3-10.
2. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control, Peter J Irwin. *Parasites and Vectors* (2009), 2 Suppl1):S4.
3. Canine babesiosis – a never-ending story, Friederike Krämer. *CVBD Digest No.4 July 2009*.



Fabricante: Biogal Galed Labs. Acs. Ltd.
TEL: +972 (0)4 9898605 FAX: +972 (0)4 9898690
email: info@biogal.co.il www.biogal.co.il
Kibbutz Galed, 1924000 - Israel