



PCRRun™

Kit para Detecção Molecular de DNA de *Babesia canis*

Somente para uso Veterinário e *In vitro*

SKUCBC104

Instruções de uso

FINALIDADE

O kit contém todos os componentes requeridos para executar o teste de forma rápida e simples.

PRINCÍPIO

O Kit de Detecção Molecular PCRRun® destina-se à detecção de *Babesia canis* em DNA *isolado de sangue e urina* usando um kit de extração de DNA N°30PRE104. O kit deve ser empregado durante uma infecção ativa e contém todos os componentes descartáveis necessários para realizar um teste fácil e preciso.

ESTOCAGEM E MANUSEIO

- 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 contaminação de DNA na reação, sempre utilizar luvas descartáveis durante a realização do teste.
- Abrir e remover os tubos de reação PCRRun das embalagens seladas de alumínio, somente imediatamente antes da sua utilização.
- **Retornar os tubos de reação PCRRun não utilizados para a embalagem de alumínio original, juntamente com o dessecante. Selar com fita adesiva.**
- Não utilize o kit se a embalagem ou os componentes estiverem danificados.
- Cada componente neste kit é adequado para uso apenas com um número de lote específico. Os componentes foram homologados no controle da qualidade como unidade de lote padrão. Não misturar componentes de diferentes números de lote.
- 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 protozoária transmitida por carrapatos em todo o mundo, causada por hemoparasitas do gênero *Babesia*. As duas espécies predominantes conhecidas por infectar naturalmente os cães são *B. canis* e *B. gibsoni*. *B. canis* é um grande organismo em formato piriforme que existe isoladamente ou emparelhado dentro de eritrócitos, enquanto *B. gibsoni* é um pequeno organismo pleomórfico. *B. canis* foi diferenciada em três subespécies (*B. canis canis*, *B. canis vogeli* e *B. canis rossii*) com base na imunidade cruzada, testes sorológicos, especificidade vetorial e filogenia molecular. A infecção é mais prevalente em estações e regiões geográficas com alta prevalência de carrapatos e outros vetores artrópodes. A transmissão também é possível por transfusão de sangue ou fômites contaminados com sangue. O período de incubação entre a exposição ao parasita e os sintomas é em média de duas semanas. Os sintomas podem ser intermitentes e podem incluir falta de energia, anorexia, fraqueza, febre, gengivas pálidas, urina laranja ou vermelha, fezes descoloridas e gânglios linfáticos aumentados. A replicação intracelular por *Babesia* resulta em anemia hemolítica direta e imunomediada. A trombocitopenia é uma característica da doença, mas petéquias ou epistaxe são muito raramente observados, exceto em casos com infecções concomitantes por *Ehrlichia* ou *Theileria*. Uma infecção grave pode afetar vários sistemas de órgãos, incluindo pulmões, trato gastrointestinal, rins e sistema nervoso. A gravidade dos sintomas depende da espécie de parasita envolvida e da capacidade do sistema imunológico do cão de se defender contra ele. Os cães que

sobrevivem à babesiose geralmente permanecem subclínicamente infectados e podem sofrer recidivas ou servir como fonte de disseminação da doença.

DIAGNÓSTICO

A babesiose é tipicamente diagnosticada na fase aguda, identificando o organismo nos esfregaços de sangue corados por Wright ou Giemsa. O diagnóstico de cães cronicamente infectados e portadores é difícil devido a parasitemias muito baixas, muitas vezes intermitentes. Os testes de anticorpo fluorescente indireto (IFA) e ELISA podem determinar retrospectivamente a doença detectando anticorpos que podem levar até 10 dias para atingir o limite de detecção. Embora a cura clínica possa ocorrer, as infecções por *Babesia* são frequentemente persistentes em cães. Mesmo após a terapia adequada, a infecção pode persistir por toda a vida do cão.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) oferece uma alternativa altamente sensível ao exame de esfregaço de sangue para diagnóstico durante a doença ativa e pode detectar a doença clínica antes da soroconversão. Além disso, a reação em cadeia da polimerase também pode ser útil para a detecção de infecção persistente, que pode durar até 27 meses.

CONTEÚDO DO KIT

Conteúdo	Quantidade
Tira PCRRun® de 4 tubos de reação simples com <i>pellets</i> liofilizados	1
Embalagem de alumínio com o dispositivo de detecção de ácido nucleico descartável.	4
Pipetas capilares de plásticos- 20 µL*	5

* Pipetas calibradas e ponteiras com barreira para aerossol podem ser usada no lugar das pipetas de plástico.

EQUIPAMENTOS E SOLUÇÕES NECESSÁRIOS:

- Biogal PCRRun® Extrator de DNA da Amostra
- Bloco de aquecimento a 60 °C compatível com tubos de 0,2 mL para PCR.
- Bloco de aquecimento é comercializado pela Biogal.
- Temporizador
- Tesoura
- Caneta marcadora permanente de ponta fina
- Luvas descartáveis

COLETA, ESTOCAGEM E TRANSPORTE

O kit é adequado para detectar ácido nucleico extraído de 50 µL de sangue total usando o Kit de Extração Rápida de DNA PCRRun® Sample Prep (Cat No. 30PRE104). As amostras de sangue devem ser coletadas em EDTA de preferência. Os anticoagulantes sanguíneos têm uma consequência substancial nas reações de PCR, portanto, é imperativo que o volume ideal de sangue seja coletado conforme indicado no tubo. Para obter melhores resultados, amostras adquiridas recentemente e extratos de DNA recém-preparados são recomendados para uso com o kit PCRRun®. A menos que recomendado de outra forma, amostras e extratos de DNA podem ser mantidos a 2-8°C por até 24 horas ou - 20 °C por um tempo maior.

PROTOCOLO - REAÇÃO PCRRun®

1. Limpe a área de trabalho para o ensaio com solução de hipoclorito a 3,5%, diluído com água numa proporção de 1:10.

2. Material para o ensaio:

- DNA extraído da amostra com o Extrator de DNA N°30PRE104
- Embalagem com os tubos de reação;
- Pipetas capilares para 20 µL de volume;
- Marcador de ponta fina;

3. Ligue o bloco de aquecimento e ajustar a 60°C. Assim que o bloco atingir a temperatura, prossiga.

4. Retire e destaque os tubos necessários para a reação PCR^{Run}® da embalagem. Quatro tubos individuais estão ligados por um espaçador de plástico fino. Utilizando tesoura pequena e limpa, destacar o número necessário de tubos sem abrir as tampas. Tomar cuidado para retornar os tubos não utilizados para o envelope de alumínio e selar completamente com fita adesiva para manter um ambiente seco. 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.

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

6. Abra cuidadosamente a tampa dos tubos de reação, um de cada vez. Com a pipeta capilar descartável de 20 µL, pipete 20 µL do DNA extraído com o Kit de Extração de DNA PCR^{Run}® e passe ao tubo de reação. Confira se todo o conteúdo da pipeta capilar foi transferido corretamente ao tubo. Bata suavemente o tubo de reação em uma superfície rígida para trazer todo o fluido para o fundo do mesmo. Incube o tubo em temperatura ambiente por 1 minuto para permitir que o *pellet* se dissolva completamente.

7. Coloque o tubo de reação no orifício apropriado no bloco de aquecimento pré-aquecido (60 °C) e incube durante exatamente 1 hora. Não abra a tampa do tubo durante ou no final do período de incubação.

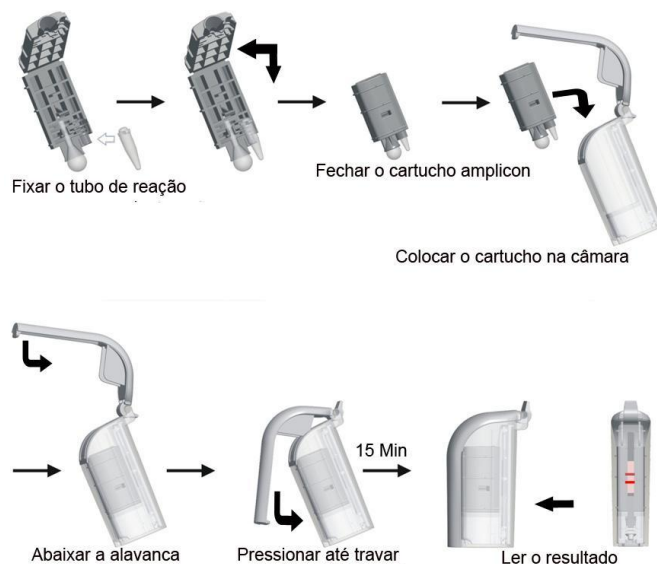
8. No final do período de incubação (1 hora), remova o tubo do bloco de aquecimento e imediatamente analise com o dispositivo de detecção de ácido nucleico.

REAÇÃO COM O DISPOSITIVO DE DETECÇÃO de DNA

É necessário um dispositivo de detecção de ácido nucleico descartável para cada amostra. Abrir e remover os componentes do dispositivo de detecção. O dispositivo é composto por duas peças de plástico, contendo no cartucho *amplicon* um bulbo com tampão e a câmara de detecção, contendo a tira de fluxo lateral (Fig. 1).

1. Verificar se o bulbo contém o tampão.
2. Identificar cada dispositivo com o número da amostra.
3. Fixar a seção da tampa do tubo de reação no espaço localizado ao lado do bulbo com tampão. Aplique uma leve pressão para prender o tubo de reação no cartucho *amplicon* (Fig. 1).
4. Feche bem o cartucho *amplicon*. Colocar o cartucho na câmara de detecção com o bulbo virado para baixo e para frente do dispositivo.
5. Empurrar a alavanca para baixo para travar o dispositivo.
6. Leia os resultados em 15 minutos. Os resultados lidos após 30 minutos são inválidos.

FIG. 1

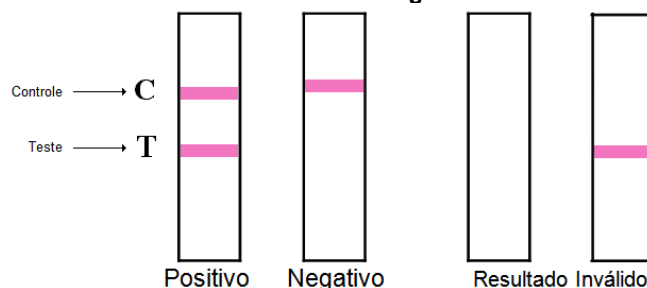


LEITURA E INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO

Para que o resultado seja válido, devem-se observar os seguintes requisitos (Fig. 2):

1. **Resultado Positivo** - Duas bandas aparecem, a linha de controle superior e a linha de ensaio inferior. O surgimento de ambas as linhas (a de controle e a linha do teste) indica a presença do DNA de *Babesia canis*.
2. **Resultado Negativo** - Uma única linha de controle aparece. A linha de controle deve aparecer independentemente de um resultado positivo ou negativo. O teste será inválido se a linha do controle não estiver presente. O aparecimento somente da linha controle indica apenas a ausência do DNA de *Babesia canis* ou que o número de cópias está abaixo do limite de detecção.

Fig. 2



LIMITAÇÕES

Como acontece com qualquer teste de diagnóstico, o resultado do PCR^{Run}® deve ser interpretado tendo em conta todos os dados clínicos e laboratoriais.

SENSIBILIDADE

Este teste pode detectar 10³ cópias do gene alvo no 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.



Importador e Distribuidor Exclusivo:
JMR Trading Ltda/VP Diagnóstico. CNPJ: 11.857.347/0001-71
Registro no MAPA: PR 000017-5
Rua Mandaguari, 1752, Pinhais, PR. Brasil, CEP: 83.325-015
Resp Téc.: Margareth Carvalo S. Agottani (CRMV-PR 3288)
SAC: info@vpdiagnostico.com.br / www.vpdiagnostico.com.br
PRODUTO PARA USO VETERINÁRIO – NÃO NECESSITA DE REGISTRO



Fabricante:
Biogal Galed Labs
Kibbutz Galed, 1924000
Tel: +972-4-9898605
www.biogal.com