

VETLISA BABESIA IgG

REF
VET038

INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE

Teste para determinação qualitativa de anticorpos IgG contra *Babesia canis* em soro ou plasma de cães, por ensaio imunoenzimático de fase sólida, em microplaca. Somente para diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou ensaio imunoenzimático.

O VETLISA BABESIA IgG é um ensaio imunoenzimático em fase sólida, baseado no princípio de imunocaptura para a detecção qualitativa de anticorpos IgG contra *Babesia canis* em soro ou plasma. Anticorpos contra *Babesia canis* presentes na amostra, se ligam ao antígeno recombinante de *Babesia canis*, que reveste a microplaca, formando complexos imobilizados: antígeno de *Babesia canis* – anticorpos anti *Babesia canis*. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados. O conjugado, formado por anticorpo anti-IgG de cão ligado a peroxidase, se liga ao complexo antígeno-anticorpo imobilizado na placa. Após a segunda incubação, a microplaca é lavada e incubada com substrato, e a cor azul é resultante da interação com os anticorpos contra o *Babesia canis* presentes na amostra.A solução de parada é adicionada para finalizar a reação, promovendo uma mudança de cor para amarelo, medida em um leitor de microplacas.

REAGENTES

- 1- Placa Sensibilizada** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Placa de Poliestireno, dividida em 12 tiras de 8 poços cada, impregnada com antígeno de *Babesia canis*.
- 2- Conjugado Concentrado (100x)** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução de anticorpo anti-IgG de cão ligado à Peroxidase.
- 3- Lavagem Concentrada (20x)** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução Tampão Fosfato, surfactante e conservante.
- 4- Diluente** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução Tampão, surfactante, estabilizante e conservante.
- 5- Substrato TMB** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução contendo Tetrametilbenzidina (TMB < 1,0 mg/mL), Solução de Ácido Cítrico < 5% e Peróxido de Ureia < 1 %.
- 6- Solução de Parada** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução de Ácido Sulfúrico 1N.
- 7- Controle Negativo** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Soro negativo para Babesia Canina, com conservante. **Potencialmente infectante.**
- 8- Controle Positivo** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Soro positivo para Babesia Canina, com conservante. **Potencialmente infectante.**
- 9- Seladores de Placa**

APRESENTAÇÃO

Componentes	Apresentação		
	1	2	5
	96 cavidades	192 cavidades	480 cavidades
1- Placa Sensibilizada	1 unidade (1 x 96 cavidades)	2 unidades (2 x 96 cavidades)	5 unidades (5 x 96 cavidades)
2- Conjugado Concentrado (100x)	1 x 300 µL	2 x 300 µL	5 x 300 µL
3- Lavagem Concentrada (20x)	1 x 50 mL	2 x 50 mL	5 x 50 mL
4- Diluente	1 x 60 mL	2 x 60 mL	5 x 60 mL
5- Substrato TMB	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL
6- Solução de Parada	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL
7-Controle Negativo	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL
8- Controle Positivo	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL
9- Seladores de Placa	3 unidades	6 unidades	15 unidades

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no quadro anterior.
- Instruções de uso (manual).

Materiais necessários, não contidos no Kit:

- 1- Pipetas capazes de dispensar volumes de 5 a 500 µL com coeficiente de variação menor que 1,5%.
- 2- Repipetador para pipetagens repetitivas de volumes de 500 µL com coeficiente de variação menor que 1,5% ou pipeta multicanal (opcional).
- 3- Lavadora de microplaca (opcional).
- 4- Leitora de ELISA com capacidade de absorbância em 450 e 630 nm de comprimento de onda.
- 5- Papel absorvente para secar as microcavidades.
- 6- Cronômetro ou relógio.
- 7- Frasco para estocar a Solução de Lavagem após diluição.
- 8- Água destilada ou deionizada.
- 9- Ferramentas de Controle de Qualidade.
- 10- Incubadora de 37 °C ± 2 °C.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8°C. O transporte pode ser feito em temperatura ambiente (até 30°C) por até 5 dias. Manter ao abrigo de luz e evitar umidade. **Não congelar.**

CUIDADOS ESPECIAIS

- 1- Somente para uso diagnóstico *in vitro* veterinário profissional.**
- 2- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.
- 3- O sachê contendo a microplaca deve ser aberto somente após atingir a temperatura ambiente. Recolocar as tiras de microcavidades não utilizadas no sachê, vedar e conservar entre 2 e 8 °C.

- 4- A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de contaminantes.

5- Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, íons diversos, e agentes oxidantes e redutores que podem alterar de forma significativa os resultados.

6- A Solução de Parada contém Ácido Sulfúrico que é um ácido forte. Portanto, manuseá-lo com devido cuidado.

7- A manipulação de todo produto que contém soro é potencialmente capaz de transmitir doenças. Portanto, é preciso tomar os devidos cuidados de biossegurança na manipulação desses produtos.

8- Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.

9- Por medida de proteção, deve-se cobrir a placa durante a reação.

10- Deve-se assegurar que o fundo da cavidade esteja limpo e seco e que não haja bolhas na superfície do líquido antes de ler a placa. Não permitir que as cavidades sequem durante o ensaio.

11- Não exponha os reagentes, especialmente o Substrato, à luz forte ou vapores de Hipoclorito durante o armazenamento ou etapas de incubação.

12- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.

13- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) disponibilizadas no site www.bioclin.com.br ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.

14- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.

15- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

AMOSTRAS

Soro ou Plasma (EDTA ou Heparina)

Amostras hemolisadas ou altamente lipêmicas não devem ser usadas.

As amostras podem ser conservadas sob refrigeração, entre 2 e 8 °C, pelo período máximo de 5 dias. Se as amostras não puderem ser analisadas dentro de 5 dias, podem ser estocadas por até 30 dias a temperatura de -20 °C.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

Estabilidade Após Aberto

Os resultados do teste de estabilidade comprovam que o kit VETLISA Babesia IgG é estável após aberto por até 30 dias. Esta estabilidade pode variar de acordo com as condições do teste e do ambiente. Portanto, sugere-se acompanhar o desempenho do produto utilizando controles internos do kit e os critérios de validação da técnica.

ATENÇÃO: Os Controles Positivo e Negativo são prontos para o uso.

PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

Solução de Lavagem

Diluir o conteúdo do frasco Nº 3 (Lavagem Concentrada) em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Após o preparo a solução pode ser estocada entre 2 a 30 °C durante, pelo menos, 30 dias. Pode ser armazenada em temperatura ambiente. Caso ocorra cristalização, aquecer a 37 °C até dissolução.

Substrato

O Substrato é pronto para o uso.

Solução de Conjugado

Diluir o Conjugado Concentrado (Reagente Nº 2) na proporção de 1:101 em Diluente (Reagente Nº 4). Prepare a solução no momento de realizar o ensaio. Para realizar um ensaio utilizando todas as cavidades do kit, misture 110 µL do Conjugado Concentrado em 11 mL de Diluente. Para realizar um ensaio utilizando 8 cavidades (1 tira), misture 10 µL do Conjugado Concentrado em 1 mL de Diluente.

IMPORTANTE: A solução de conjugado diluída não pode ser estocada. Por isso, prepare apenas a quantidade necessária para realizar o ensaio.

Diluição das Amostras

Em um tubo de ensaio, diluir 15 µL da amostra em 300 µL de Diluente (Reagente Nº 4), se for realizar o ensaio em duplicata. Tampar o tubo e agitar em vórtex gentilmente ou homogeneizar manualmente por inversão. As diluições não podem ser armazenadas.

TÉCNICA

Para uso em equipamentos automáticos, consulte o SAC (Serviço de Assessoria do Cliente).

Antes de iniciar o ensaio, colocar todos os reagentes, Controles e Amostras para estabilizarem em temperatura ambiente (15 - 30°C) por no mínimo 30 minutos. Retornar as tiras não utilizadas para a embalagem original selada.

1- Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Controles e Amostras (podendo ser testados em duplicata). **2-** Separar a primeira cavidade para o Branco (OPCIONAL). **3-** Pipetar 100 µL do Controle Negativo e do Controle Positivo nas cavidades previamente determinadas.

Obs: Os controles estão prontos para o uso, não sendo necessário diluí-los.

4- Pipetar 100 µL das Amostras previamente diluídas nas cavidades previamente determinadas. Na cavidade Branco, caso tenha feito a opção, pipetar somente 100 µL do diluente.

5- Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cobrir as cavidades com selador de placa.

6- Incubar por 30 minutos a 37 °C ± 2 °C.

7- Descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (lavadora) ou por decantação (manual). Usar 300µL/ cavidade aproximadamente de Solução de Lavagem previamente diluída, para um total de cinco (5) ciclos de lavagem. Agitar por três segundos em cada lavagem. Para a garantia da secagem da placa, ao final da lavagem, bater a placa por alguns segundos em papel absorvente.

IMPORTANTE: Lavagem/secagem deficiente pode causar resultados inadequados.

8- Pipetar 100 µL de Conjugado previamente diluído em cada cavidade, inclusive na cavidade do Branco.

9- Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cobrir as cavidades com selador de placa.

10- Incubar por 30 minutos a 37 °C ± 2 °C.

11- Repetir o item 7.

12- Adicionar 100 µL de Substrato TMB em cada microcavidade.

13- Homogeneizar gentilmente durante ± 3 segundos. Cobrir as cavidades com selador de placa.

14- Incubar por 10 minutos a 37°C, protegido da luz.

15- Retirar o selador de placas das microcavidades.

16- Pipetar 100 µL de Solução de Parada em cada microcavidade.

17- Homogeneizar gentilmente durante ± 3 segundos.

18- Leia a absorbância em leitora de ELISA em filtro duplo de 450nm (filtro primário) / 630nm (filtro secundário) em até no máximo 10 minutos após adição da Solução de Parada.

VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

Verifique se os resultados obtidos para leitura dos Controles e do Branco estão compatíveis com a especificação abaixo:

ITEM	ABSORBÂNCIA (FILTRO DUPLO)
Branco	< 0,050
Controle Negativo	0,100 a 0,300
Controle Positivo	> 0,800

Caso os valores se encontrem fora dos valores esperados, deve-se repetir o ensaio.

Cálculos

Calcular o Cut Off de acordo com a seguinte fórmula:

Cut Off = Absorbância Média do Controle Negativo + 0,300

Exemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Controle Negativo	A1 = 0,208
	A2 = 0,212
Cut Off = Absorbância Média do Controle Negativo + 0,300	(0,208 + 0,212) / 2 + 0,300 = 0,510

Calcular o Índice dividindo a absorbância da amostra pelo valor de Cut Off.

Exemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Amostra	0,992
Controle Negativo	0,210
Valor de Cut Off	0,510
Índice: Abs. da Amostra / Valor de Cut Off	0,992 / 0,510 = 1,95

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Após o cálculo do índice das amostras, considerar os índices abaixo para a determinação dos resultados.

ITEM	ABSORBÂNCIA
Negativo	< 0,9
Positivo	> 1,1
Indeterminado	≥ 0,9 e ≤ 1,1

Nota: No caso de resultado indeterminado, a amostra deve ser reanalisada. As amostras que obtiverem resultados repetidamente indeterminados devem ser retestadas utilizando um método alternativo. Se os resultados permanecem indeterminados, deve-se coletar uma nova amostra em duas semanas. Deve prevalecer o resultado da última amostra coletada. Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico veterinário responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratament o do paciente.

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

A interpretação de um teste diagnóstico deve ser realizada por médico veterinário habilitado e deve considerar também o histórico e a avaliação clínica do animal. Desta forma, um resultado negativo não exclui a possibilidade de exposição uma vez que sofre influencia de diversos fatores como a resposta imunológica individual contra o patógeno, a condição de saúde do animal, tempo de exposição ao patógeno, entre outras.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

O Laboratório Clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, onde procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente estabelecidos. É importante ressaltar que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica característica, que deve ser monitorada pelos próprios laboratórios. Para tanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das medições.

DESEMPENHO DO PRODUTO

PRECISÃO

Repetibilidade

A repetibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com valores diferentes, obtendo-se os seguintes resultados de absorbância:

REPETIBILIDADE	ABSORBÂNCIA		
	1	2	3
Média	0,780	0,980	0,090
Desvio Padrão	0,037	0,077	0,002
Coefficiente de Variação (%)	4,730	7,800	2,604

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas durante 3 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com valores diferentes, obtendo-se os seguintes resultados de absorbância:

REPRODUTIBILIDADE	ABSORBÂNCIA		
	1	2	3
Média	0,780	1,000	0,093
Desvio Padrão	0,050	0,049	0,005
Coefficiente de Variação (%)	6,414	4,879	5,072

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

O kit VETLISA BABESIA IgG analisou amostras clínicas em comparação com outro método de ELISA. Os resultados mostram que o kit VETLISA BABESIA IgG apresenta sensibilidade clínica de 97,4% e especificidade clínica de 97,8%.

VETLISA Babesia IgG	Método	Referência		Total
	Resultado	Negativo	Positivo	
	Negativo	88	1	89
	Positivo	2	37	39
Resultado Total		90	38	128

Sensibilidade Clínica: 97,4% (37/38)

Especificidade Clínica: 97,8% (88/90)

Precisão: 97,7% [(88 + 37) / (90 + 38)]

SIGNIFICADO CLÍNICO

A babesiose é causada por protozoários do gênero Babesia (*Babesia canis*, *B. gibsoni* e *B. vogeli*) que acometem cães domésticos, silvestres e o homem. A transmissão da Babesia ocorre pela picada do carrapato marrom (*Rhipicephalus sanguineus*), durante o repasto sanguíneo. O período de incubação entre a infecção e o aparecimento dos sinais clínicos varia entre 7 e 31 dias, podendo a infecção se manifestar de forma superaguda, aguda, crônica ou assintomática. Os sinais clínicos mais comuns nas formas aguda e superaguda incluem anemia, trombocitopenia, hemoglobinúria, febre, mucosas pálidas, taquicardia, taquipnéia, depressão, anorexia, icterícia e esplenomegalia. Animais acometidos de forma crônica apresentam perda de peso e anorexia. Os anticorpos começa, a ser produzidos entre a 1ª e a 3ª semana após a infecção, e são facilmente detectados em testes sorológicos, auxiliando no diagnóstico da babesiose. De forma importante, os resultados obtidos nos exames sorológicos devem ser avaliados com cautela, e em conjunto com achados laboratoriais e clínicos, e a conclusão deve ser realizada por um médico veterinário.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1- TABOADA J, MERCHANT SR. Babesiosis of Companion Animals and Man. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. n.1. v. 21, p. 103-123. Janeiro, 1991.

2- COMAZZI S, PALTRINIERI S, MANFREDI MT, AGNES F. Diagnosis of canine babesiosis by Percoll gradient separation of parasitized erythrocyties. Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation. v.11, p. 102-104. 1999.

3- BOOZER AL, MACINTIRE DK. CANINE BABESIOSIS. Vet Clin Small Anim, v.33, p.885-904, 2003.

4- BRANDÃO LP, HAGIWARA MK, MYIASHIRO SI. Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with Babesia canis and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. Vet Parasitol., v.114, p.253-265, 2003.

5- VERCAMMEN F, DE DEKEN R, MAES L. Duration of protective immunity in experimental canine babesiosis after homologous and hererologous challenge. Veterinary Parasitology, v.68, p. 51-55, 1997.

6- Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

GARANTIA DE QUALIDADE

Antes de serem liberados para o consumo, todos os reagentes produzidos pela **Quibasa Química Básica Ltda** são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.



QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda
Rua Teles de Menezes, 92 – Santa Branca
CEP 31.565 -130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel.: 31 3439.5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente
Tel.: 0800 0315454 | E-mail: sac@bioclin.com.br

Produto Licenciado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento desde 10/04/2019 sob o número 10.235/2019.

Responsável Técnico:
Dra. Camila Eckstein (CRMV/MG 20611)

Revisão: Outubro/2022

REF

NÚMERO DE CATALOGO

LOT

NÚMERO DO LOTE

FABRICADO POR

CONTROLE

CONTROLE POSITIVO

CONTROLE NEGATIVO

LIMITE DE TEMPERATURA (conservar a)

RISCO BIOLÓGICO

INFLÂMVEL

CORROSIVO

TÓXICO

NÃO UTILIZAR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA

PRODUTO ESTERELIZADO

PERIGO

CONTROLE

CONTROLE POSITIVO

CONTROLE NEGATIVO

LIMITE DE TEMPERATURA (conservar a)

RISCO BIOLÓGICO

INFLÂMVEL

CORROSIVO

TÓXICO

NÃO UTILIZAR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA

PRODUTO ESTERELIZADO

PERIGO

VETLISA BABESIA IgG

REF
VET038

INSTRUCCIONES DE USO

FINALIDAD

Prueba para la determinación cualitativa de anticuerpos IgG contra *Babesia canis* en suero o plasma de perros, por ensayo inmunoenzimatico en fase sólida, en microplaca. Solo para diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE ACCIÓN

Metodología: Enzimaimunoensayo o ensayo inmunoenzimatico

El VETLISA BABESIA IgG es un ensayo inmunoenzimatico en fase sólida, basado en el principio de inmunocaptura para la detección cualitativa de anticuerpos IgG contra *Babesia canis* presentes en suero o plasma. Los anticuerpos contra *Babesia canis* presentes en la muestra, se unen al antígeno recombinante *Babesia canis*, que recubre la microplaca, formando complejos inmovilizados: antígeno de *Babesia canis* – anticuerpos anti-*Babesia canis*. Después de la incubación inicial, la microplaca se lava para eliminar los materiales no unidos. El conjugado, formado por el anticuerpo anti-IgG de perro unido a la peroxidasa, se une al complejo antígeno-anticuerpo inmovilizado en la placa. Después de la segunda incubación, la microplaca se lava y se incuba con sustrato y el color azul resulta de la interacción con los anticuerpos contra *Babesia canis* presentes en la muestra. La solución de parada se agrega para finalizar la reacción, promoviendo un cambio de color a amarillo, medido en un lector de microplacas.

REAGENTES

- 1- Placa Sensibilizada** - Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Placa de poliestireno, dividida en 12 tiras de 8 pocillos cada una, impregnada con antígeno de *Babesia canis*.
- 2- Conjugado Concentrado (100x)** - Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución de anticuerpo anti-IgG de perro ligado a Peroxidasa.
- 3- Lavado Concentrado (20x)** - Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución Tampón de Fosfato, surfactante y conservante.
- 4- Diluyente** - Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución Tamponada, surfactante, estabilizante y conservante.
- 5- Sustrato TMB** - Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Solución que contiene Tetrametilbenzidina (TMB < 1.0 mg / mL), Solución de Ácido Cítrico <5% y Peróxido de Urea < 1%.
- 6- Solución de Parada** - Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Ácido Sulfúrico 1N.
- 7- Control Negativo** - Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Suero no reactivo para Babesia canina, con conservante. **Potencialmente infeccioso.**
- 8- Control Positivo** - Almacenar entre 2 y 8°C. Contiene: Suero reactivo para para Babesia canina, con conservante. **Potencialmente infeccioso.**
- 9- Selladores de Placa**

PRESENTACIÓN

Componentes	Presentación		
	1	2	3
	96 pocillos	192 pocillos	480 pocillos
1- Placa Sensibilizada	1 unidad (1 x 96 pocillos)	2 unidades (2 x 96 pocillos)	5 unidades (5 x 96 pocillos)
2- Conjugado Concentrado (100x)	1 x 300 µL	2 x 300 µL	5 x 300 µL
3- Lavado Concentrado (20x)	1 x 50 mL	2 x 50 mL	5 x 50 mL
4- Diluyente	1 x 60 mL	2 x 60 mL	5 x 60 mL
5- Sustrato TMB	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL
6- Solución de Parada	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL
7- Control Negativo	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL
8- Control Positivo	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL
9- Selladores de Placa	3 unidades	6 unidades	15 unidades

EQUIPAMIENTOS E INSUMOS OPERACIONALES

Materiales contenidos en el kit:

- Reactivos descritos en el cuadro anterior.
- Instrucciones de uso (manual).

Materiales necesarios, no contenidos en el kit:

- 1- Pipetas capaces de dispensar volúmenes de 5 a 500 µL con un coeficiente de variación inferior al 1,5%.
- 2- Repetidor para pipeteo repetitivo de volúmenes de 500 µL con coeficiente de variación inferior al 1,5% o pipeta multicanal (opcional).
- 3- Lavadora de microplacas (opcional).
- 4- Lector de ELISA con capacidad de absorbancia a 450 y 630 nm de longitud de onda.
- 5- Papel absorbente para secar los pozos.
- 6- Cronómetro o reloj.
- 7- Frasco para almacenar la Solución de Lavado después de la dilución.
- 8- Agua destilada o desionizada.
- 9- Herramientas de control de calidad.
- 10- Incubadora a 37 °C ± 2 °C.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

La temperatura de almacenamiento do producto deberá ser de 2 a 8°C. El transporte puede realizarse a temperatura ambiente (até 30°C) por até 5 días. Mantener al abrigo de la luz y evitar la humedad. **No congelar.**

CUIDADOS ESPECIALES

- 1- Solo para uso de diagnóstico *in vitro* veterinario profesional.
- 2- Seguir estrictamente la metodología propuesta para obtener resultados precisos.
- 3- El sobre que contiene la microplaca debe abrirse solo después de alcanzar la temperatura ambiente. Vuelva a colocar las tiras de los micropocillos no utilizados en el sobre, selle y almacene entre 2 y 8 °C.

- 4- El agua utilizada para limpiar el material debe ser fresca y libre de contaminantes.
- 5- Las columnas desionizadoras saturadas liberan agua alcalina, diferentes iones y agentes oxidantes y reductores que pueden alterar significativamente los resultados.
- 6- La solución de parada contiene ácido sulfúrico, que es un ácido fuerte. Así que manipúlelo con el debido cuidado.
- 7- La manipulación de cualquier producto que contenga suero es potencialmente capaz de transmitir enfermedades. Por lo tanto, es necesario tomar las debidas precauciones de bioseguridad al manipular estos productos.
- 8- Pipetear los reactivos siempre en el mismo orden para minimizar la diferencia de tiempo de reacción entre los micropocillos.
- 9- Como medida de protección, la placa debe cubrirse durante la reacción.
- 10- Asegúrese de que el fondo de la cavidad esté limpio y seco y que no haya burbujas en la superficie del líquido antes de leer la placa. No permita que los pocillos se sequen durante el ensayo.
- 11- No exponga los reactivos, especialmente el sustrato, a luz fuerte o vapores de hipoclorito durante los pasos de almacenamiento o incubación.
- 12- Recomendamos aplicar la normativa local, estatal y federal de protección ambiental para que la eliminación de reactivos y material biológico se realice de acuerdo con la legislación vigente.
- 13- Para obtener información relacionada con la bioseguridad o en caso de accidentes con el producto, consulte la MSDS (Ficha de Información de Seguridad para Productos Químicos) disponible en el sitio web www.bioclin.com.br o a solicitud de la SAC (Servicio de Atención al Cliente) de Quibasa.
- 14- No utilice el producto en caso de daños en el embalaje.
- 15- Es fundamental que los instrumentos y equipos utilizados estén debidamente calibrados y sometidos a un mantenimiento periódico.

MUESTRAS

Suero o Plasma (EDTA o Heparina)

No se deben utilizar muestras hemolizadas o muy lipémicas. Las muestras pueden conservarse refrigeradas, entre 2 y 8 °C, durante un período máximo de 5 días. Si las muestras no se pueden analizar en 5 días, se pueden almacenar hasta 30 días a una temperatura de -20 °C.

DESCRIZACIÓN DEL PROCESO

Estabilidad Después de Abierto

Los resultados de la prueba de estabilidad demuestran que el kit VETLISA Babesia IgG es estable después de abrirlo hasta por 30 días. Esta estabilidad puede variar según las condiciones de prueba y el entorno. Por lo tanto, se sugiere monitorear el desempeño del producto utilizando los controles internos del kit y los criterios de validación de la técnica.

ATENCIÓN: Los Controles Positivo y Negativo están listos para usar.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS DE TRABAJO

Solucion de Lavado

Diluir el contenido del vial N° 3 (Lavado Concentrado) en 1000 mL de agua destilada o desionizada. Una vez preparada, la solución puede almacenarse entre 2 y 30 °C durante al menos 30 días. Puede conservarse a temperatura ambiente. Si se produce la cristalización, calentar a 37 °C hasta que se disuelva.

Sustrato

El sustrato está listo para su uso.

Solución de Conjugado

Diluya el Conjugado Concentrado (Reactivo No. 2) en la proporción de 1:101 en Diluyente (Reactivo No. 4). Prepare la solución al realizar la prueba. Para realizar un ensayo utilizando todos los pocillos del kit, mezcle 110 µL de Conjugado Concentrado en 11 mL de Diluyente. Para realizar un ensayo utilizando 8 pocillos (1 tira), mezcle 10 µL del Conjugado Concentrado en 1 mL de Diluyente.

IMPORTANTE: La solución de conjugado diluido no se puede almacenar. Por lo tanto, prepare solo la cantidad necesaria para realizar la prueba.

Diluición de Muestras

En un tubo de ensayo, diluya 15 µL de la muestra en 300 µL de Diluyente (Reactivo N° 4), si la prueba se va a realizar por duplicado. Tape el tubo y agite suavemente en vórtex o mezcle manualmente por inversión. Las diluciones no se pueden almacenar.

TÉCNICA

Para uso en equipos automáticos, consultar al Servicio de Atención al Cliente (SAC).

Antes de comenzar el ensayo, colocar todos los reactivos, Controles y Muestras para estabilizarse a temperatura ambiente (15 - 30°C) durante al menos 30 minutos. Devuelva las tiras no utilizadas al embalaje original sellado.

- 1- Separar las cavidades a ser utilizadas considerando: Controles y Muestras (puede probar en duplicado).
- 2- Separar lo primero pocillo para el Blanco (OPCIONAL).
- 3- Pipetear 100 µL del Control Negativo e del Control Positivo en los pocillos previamente determinados.
- Nota: Los controles estás listos para usar, no hay necesidad de diluirlos.**
- 4- Pipetear 100 µL de las muestras previamente diluidas en los pocillos previamente determinados. En la cavidad Blanco, si ha elegido, pipetear solo 100 µL del diluyente.
- 5- Homogeneizar suavemente durante ± 10 segundos. Cubrir las cavidades con sellador de placas.
- 6- Incubar por 30 minutos a 37 °C ± 2 °C.

7- Descartar el contenido de las cavidades por aspiración (lavadora) o por decantación (manual). Utilizar 300µL/pocillo aproximadamente de Solución de Lavado previamente diluida, para un total de cinco (5) ciclos de lavado. Agite durante tres segundos con cada lavado. Para la garantía del secado de la placa, al final del lavado, golpear la placa por unos segundos en papel absorbente.

IMPORTANTE: Lavado/secado deficiente puede causar resultados inadecuados.

8- Pipetear 100 µL de Conjugado previamente diluido en cada pocillo, incluso en la cavidad del Blanco.

9- Homogeneizar suavemente durante ± 10 segundos. Cubrir las cavidades con el sellador de placa.

10- Incubar por 30 minutos a 37 °C ± 2 °C.

11- Repetir el ítem 7.

12- Agregar 100 µL de Sustrato TMB a cada pocillo.

13- Homogeneizar suavemente durante ± 3 segundos. Cubrir las cavidades con el sellador de placa.

14- Incubar durante 10 minutos a 37°C, protegido de la luz.

15- Retirar el sellador de placa de las cavidades.

16- Pipetear 100 µL de Solución de Parada en todas las cavidades.

17- Homogeneizar suavemente durante ± 3 segundos.

18- Lea la absorbancia en un lector de ELISA en un filtro doble de 450 nm (filtro primario) / 630 nm (filtro secundario) dentro de un máximo de 10 minutos después de agregar la Solución de Parada.

VERIFICACIÓN DE LA TÉCNICA

Verifique se los resultados obtenidos para lectura de los Controles y el Blanco sean compatibles con la especificación:

ITEM	ABSORBANCIA (FILTRO DOBLE)
Blanco	< 0,050
Control Negativo	0,100 a 0,300
Control Positivo	> 0,800

Si los valores están fuera de los valores esperados, la prueba debe repetirse.

Cálculos

Calcule el Cut Off de acuerdo con la siguiente fórmula:

Cut-Off = Absorbancia de Control Negativo Promedio + 0,300
Ejemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Control Negativo	A1 = 0,208
	A2 = 0,212
Cut Off = Absorbancia promedio del Control Negativo + 0,300	(0,208 + 0,212) / 2 + 0,300 = 0,510

Calcule el índice dividiendo la absorbancia de la muestra por el valor de corte.

Ejemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Muestra	0,992
Control Negativo	0,210
Valor de Cut Off	0,510
Índice: Abs. de la Muestra / Valor de Cut Off	0,992 / 0,510 = 1,95

INTERPRETACIÓN DEL RESULTADO

Después de calcular el índice de la muestra, considere los índices siguientes para determinar los resultados.

RESULTADOS	ÍNDICE
Negativo	< 0,9
Positivo	> 1,1
Indeterminado	≥ 0,9 y ≤ 1,1

Nota: En caso de un resultado indeterminado, la muestra debe volver a analizarse. Las muestras que obtienen resultados indeterminados repetidamente deben volver a analizarse utilizando un método alternativo. Si los resultados siguen siendo indeterminados, se debe recolectar una nueva muestra dentro de las dos semanas. Debe prevalecer el resultado de la última muestra recolectada, los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el veterinario responsable, y no es el único criterio para determinar el diagnóstico y / o tratamiento del paciente.

LIMITACIONES DE PRUEBA

La interpretación de una prueba diagnóstica debe ser realizada por un médico veterinario calificado y también debe considerar la historia y evaluación clínica del animal. Así, un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición ya que en él influyen varios factores como la respuesta inmune individual frente al patógeno, el estado de salud del animal, el tiempo de exposición al patógeno, entre otros.

CONTROL INTERNO DE CALIDAD

El Laboratorio Clínico debe poseer un programa interno de control de calidad, donde procedimientos, normas, límites y tolerancia para variaciones sean claramente establecidos. Es importante resaltar que todos los sistemas de medición presenten una variabilidad analítica característica, que debe ser controlada por los propios laboratorios. Por lo tanto, es recomendable la utilización de controles, que permiten evaluar la precisión y la exactitud de las dosificaciones.

DESEMPEÑO DEL PRODUCTO

PRECISIÓN

Repetibilidad

La repetibilidad fue calculada a partir de 10 determinaciones sucesivas, utilizando 3 muestras con valores diferentes, obteniéndose los siguientes resultados de absorbancia:

REPETIBILIDAD	ABSORBANCIA		
	1	2	3
Media	0,780	0,980	0,090
Desviación estándar	0,037	0,077	0,002
Coefficiente de Variación (%)	4,730	7,800	2,604

Reproducibilidad

La reproducibilidad fue calculada a partir de 10 determinaciones sucesivas durante 3 días consecutivos, utilizando 3 muestras con valores diferentes, obteniéndose los siguientes resultados:

REPRODUCTIBILIDAD	ABSORBANCIA		
	1	2	3
Media	0,780	1,000	0,093
Desviación estándar	0,050	0,049	0,005
Coefficiente de Variación (%)	6,414	4,879	5,072

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICA

El kit VETLISA BABESIA IgG analizó muestras clínicas en comparación con otro método de ELISA. Los resultados muestran que el kit VETLISA BABESIA IgG presenta la sensibilidad clínica del 97,4% y la especificidad clínica es del 97,8%.

VETLISA Babesia IgG	Método	Referencia		Total
	Resultado	Negativo	Positivo	
		88	1	89
	Negativo	2	37	39
	Positivo	90	38	128

Sensibilidad Clínica: 97,4% (37/38)

Especificidad Clínica: 97,8% (88/90)

Precisión: 97,7% [(88+37)/(90+38)]

SIGNIFICACIÓN CLÍNICA

La babesiosis es causada por protozoos del género Babesia (*Babesia canis*, *B. gibsoni* y *B. vogeli*) que afectan a perros domésticos, salvajes y humanos. La babesia se transmite por la picadura de la garrapata parda (*Rhipicephalus sanguineus*) durante la alimentación con sangre. El periodo de incubación entre la infección y la aparición de los signos clínicos varía entre 7 y 31 días, y la infección puede manifestarse en forma sobreaguda, aguda, crónica o asintomática. Los signos clínicos más comunes en las formas aguda y superaguda incluyen anemia, trombocitopenia, hemoglobinuria, fiebre, mucosas pálidas, taquicardia, taquipnea, depresión, anorexia, ictericia y esplenomegalia. Los animales crónicamente afectados muestran pérdida de peso y anorexia. Los anticuerpos comienzan a producirse entre la primera y la tercera semana después de la infección y se detectan fácilmente en las pruebas serológicas, lo que ayuda en el diagnóstico de la babesiosis. Es importante destacar que los resultados obtenidos en las pruebas serológicas deben evaluarse con cautela y en conjunto con los hallazgos clínicos y de laboratorio, y la conclusión debe ser realizada por un veterinario.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- TABOADA J, MERCHANT SR. Babesiosis of Companion Animals and Man. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. n.1. v. 21, p. 103-123. Janeiro, 1991.

2- COMAZZI S, PALTRINIERI S, MANFREDI MT, AGNES F. Diagnosis of canine babesiosis by Percoll gradient separation of parasitized erythrocytes. Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation. v.11, p. 102-104. 1999.

3- BOOZER AL, MACINTIRE DK. CANINE BABESIOSIS. Vet Clin Small Anim, v.33, p.885-904, 2003.

4- BRANDÃO LP, HAGIWARA MK, MYIASHIRO SI. Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with Babesia canis and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. Vet Parasitol., v.114, p.253-265, 2003.

5- VERCAMMEN F, DE DEKEN R, MAES L. Duration of protective immunity in experimental canine babesiosis after homologous and hererologous challenge. Veterinary Parasitology, v.68, p. 51-55, 1997.

6- Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

GARANTÍA DE CALIDAD

Antes de ser liberados para el consumo, todos los reactivos de Quibasa son testados por el Departamento de Control de Calidad. La calidad de los reactivos es asegurada hasta la fecha de validez mencionada en el embalaje, desde que sean almacenados y transportados en las condiciones adecuadas.



QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rúa Teles de Menezes, 92 - Santa Branca

CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil

Tel.: +55 31 3439.5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br

CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Industria Brasileira

ATENIMIENTO AL CONSUMIDOR

Servicio de Atendimento al Cliente

Tel.: 0800 0315454 | E-mail: sac@bioclin.com.br

Producto con licencia en el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento desde el 10/04/2019 con el número 10.235/2019.

Responsable técnico:

Dra. Camila Eckstein (CRMV/MG 20611)

Revisión: Octubre/2022

SIMBOLOGÍA UNIVERSAL

	NUMERO DE CATALOGO		FABRICADO POR
	NUMERO DE LOTE		CONTROLAR
	FECHA DE FABRICACIÓN		CONTROL POSITIVO
	FECHA DE VALIDEZ (último día del mes)		CONTROL NEGATIVO
	LÍMITE DE TEMPERATURA (tienda)		RIESGO BIOLÓGICO
	EL CONTENIDO ES SUFICIENTE PARA <N> PRUEBA		INFLAMABLE
	VER INSTRUCCIONES DE USO		CORROSIVO
	PRODUCTO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PROTEGER DE LUZ Y CALOR		NO UTILICE SI EL EMBALAJE ESTA DAÑADA
	NO REUTILIZA		PRODUCTO ESTERILIZADO
	PRECAUCIÓN		PELIGRO

VETLISA BABESIA IgG

[REF] VET038

USAGE INSTRUCTIONS

PURPOSE

Test for qualitative determination of IgG antibodies against *Babesia canis* using dog serum or plasma, by solid phase enzyme immunoassay, in microplate. For *in vitro* diagnostic use only.

PRINCIPLE OF ACTION

Methodology: Enzyme immunoassay or immunoenzymatic
The VETLISA BABESIA IgG is an immunoenzymatic assay in solid phase, based on the principle of immunocapture for the qualitative detection of IgG antibodies against *Babesia canis* in serum or plasma. Antibodies against *Babesia canis* present in the sample, bind to the recombinant antigen of *Babesia canis* coated on the microplate, forming immobilized complexes: *Babesia canis* antigen – anti-*Babesia canis* antibodies. After the initial incubation, the microplate is washed to eliminate unbound materials. The conjugate, formed by the anti-dog IgG antibody conjugated to peroxidase, binds the immobilized antigen-antibody complex on the plate. After the second incubation, the microplate is washed and incubated with substrate, and the blue color results from the interaction with the antibodies against *Babesia canis* present in the sample.The stop solution is added to stop the reaction, promoting a color change to yellow, measured in a microplate reader.

REAGENTS

- 1- Sensitized Plate-** Store between 2 and 8°C. Contains: Polystyrene plate, divided into 12 strips of 8 wells each, impregnated with *Babesia canis* antigen.
- 2- Concentrated Conjugate (100x)** - Store between 2 and 8°C. Contains: Peroxidase-linked anti-dog IgG antibody solution.
- 3- Concentrated Wash (20x)** - Store between 2 and 8°C. Contains: Phosphate Buffer Solution, surfactant and preservative.
- 4- Diluent** - Store between 2 and 8°C. Contains: Buffer solution, surfactant, stabilizer and preservative.
- 5- Substrate TMB** - Store between 2 and 8°C. Contains: Solution containing Tetramethylbenzidine (TMB < 1.0 mg / mL), Citric Acid Solution <5% and Urea Peroxide <1%.
- 6- Stop Solution** - Store between 2 and 8°C. Contains: 1N Sulfuric Acid.
- 7- Negative Control** - Store between 2 and 8°C. Contains: Non-reactive serum for canine Babesia, with preservative. **Potentially infectious.**
- 8- Positive Control** - Store between 2 and 8°C. Contains: Reactive serum for canine Babesia, with preservative. **Potentially infectious.**
- 9- Plate Sealers**

PRESENTATIONS

COMPONENTS	PRESENTATION		
	1	2	3
	96 wells	192 wells	480 wells
1- Sensitized Plate	1 unit (96 wells)	2 units (2 x 96 wells)	5 units (5 x 96 wells)
2- Concentrated Conjugate (100x)	1 x 300 µL	2 x 300 µL	5 x 300 µL
3- Concentrated Wash (20x)	1 x 50 mL	2 x 50 mL	5 x 50 mL
4- Diluent	1 x 60 mL	2 x 60 mL	5 x 60 mL
5- Substrate TMB	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL
6- Stop Solution	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL
7- Negative Control	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL
8- Positive Control	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL
9- Plate Sealers	3 units	6 units	15 units

EQUIPMENTS AND OPERATIONAL INPUTS

Materials contained in the kit:

- Reagents described in the previous table.
- Instructions for use (manual).

Materials needed, but not contained in the kit:

- 1-** Pipettes capable of dispensing volumes of 5 to 500 µL with a variation coefficient of less than 1.5%.
- 2-** Repipettor for repetitive pipetting of volumes of 500 µL with coefficient of variation less than 1.5% or multichannel pipette (optional).
- 3-** Microplate washer (optional).
- 4-** ELISA reader with absorbance capacity at 450 and 630 nm wavelength.
- 5-** Absorbent paper to dry the wells.
- 6-** Stopwatch or watch.
- 7-** Bottle to store the Washing Solution after dilution.
- 8-** Distilled or deionized water.
- 9-** Quality Control Tools.
- 10-** Incubator at 37 °C ± 2 °C.

STORAGE AND TRANSPORT CONDITIONS

The product storage temperature should be 2 to 8 °C. Transport can be carried out at room temperature (30°C) for up to 5 days. Keep away from light and avoid humidity. **Do not freeze.**

SPECIAL CARE

- 1- For professional veterinary *in vitro* diagnostic use only.**
- 2-** Strictly follow the proposed methodology to obtain accurate results.
- 3-** The sachet containing the microplate must be opened only after reaching room temperature. Replace strips from unused microwells in the sachet, seal and store at 2 to 8 °C.

4- The water used to clean the material must be fresh and free of contaminants.

5- Saturated deionizer columns release alkaline water, different ions, and oxidizing and reducing agents that can significantly alter the results.

6- The Stop Solution contains Sulfuric Acid which is a strong acid. So handle it with due care.

7- The handling of any product that contains serum is potentially capable of transmitting diseases. Therefore, it is necessary to take proper biosafety precautions when handling these products.

8- Pipette the reagents always in the same order to minimize the difference in reaction time between the microwells.

9- For protection measure, the plate must be covered during the reaction.

10- Ensure that the bottom of the cavity is clean and dry and that there are no bubbles on the surface of the liquid before reading the plate. Do not allow wells to dry during the assay.

11- Do not expose reagents, especially Substrate, to strong light or Hypochlorite vapors during storage or incubation steps.

12- We recommend applying local, state and federal regulations for environmental protection so that the disposal of reagents and biological material is done in accordance with current legislation.

13- To obtain information related to biosafety or in case of accidents with the product, consult the MSDS (Safety Information Sheet for Chemical Products) available on the website www.bioclin.com.br or upon request by the SAC (Service of Customer Service) by Quibasa.

14- Do not use the product in case of damage to the packaging.

15- It is essential that the instruments and equipment used are properly calibrated and subjected to periodic maintenance.

SAMPLES

Serum or Plasma (EDTA or Heparin)

Hemolyzed or highly lipemic samples should not be used. The samples can be kept refrigerated, between 2 and 8 °C, for a maximum period of 5 days. If the samples cannot be analyzed within 5 days, they can be stored for up to 30 days at a temperature of -20 °C.

PROCESS DESCRIPTION

Stability After Open

The results of the stability test show that the VETLISA Babesia IgG kit is stable after being opened up to 30 days. This stability may vary according to the test conditions and the environment. Therefore, it is suggested to monitor the performance of the product using internal controls of the kit and the criteria for validating the technique.

VETERINARY USE

ATTENTION: The Positive and Negative Controls are ready to use.

PREPARATION OF WORK REAGENTS

Washing Solution

Dilute the contents of vial N° 3 (Concentrated Washing Solution) in 1000 mL of distilled or deionized water. After preparation, the solution can be stored at 2 to 30 °C for at least 30 days. It can be stored at room temperature. If crystallization occurs, heat to 37 °C until dissolved.

Substrate

The Substrate is ready for use.

Conjugate Solution

Dilute the Concentrated Conjugate (Reagent N° 2) in the ratio of 1:101 in Diluent (Reagent N° 4). Prepare the solution at the moment of performing the test.
To perform an assay using all cavities in the kit, mix 110 µL of Concentrated Conjugate in 11 mL of Diluent.
To perform an assay using 8 cavities (1 strip), mix 10 µL of the Concentrated Conjugate in 1 mL of Diluent.

IMPORTANT: The diluted conjugate solution cannot be stored. Therefore, prepare only the amount necessary to perform the test.

Sample Dilution

In a test tube, dilute 15 µL of the sample in 300 µL of Diluent (Reagent N° 4), if performing the assay in duplicate. Cap tube and vortex gently or mix manually by inversion. Dilutions cannot be stored.

TECHNIQUE

For use in automatic equipment, consult the Customer Service Department (SAC).

Before starting the assay, place all reagents, Controls and Samples to stabilize at room temperature (15 - 30°C) for at least 30 minutes. Return the unused strips to the original sealed packaging.

1- Separate the wells to be used considering: Controls and Samples ((it is recommended to test in duplicate).

2- Separate the first well for the Blank (OPTIONAL).

3- Pipette 100 µL of the Negative Control and the Positive Control into the previously determined cavities.

Note: The controls are ready to use, there is no need to dilute them.

4- Pipette 100 µL of the previously diluted samples into the previously determined cavities. In the Blank cavity, if you have chosen, pipette only 100 µL of the diluent

5- Homogenize gently for ± 10 seconds. Cover the cavities with plate sealer.

6- Incubate for 30 minutes at 37 °C ± 2 °C.

7- Discard the content of the cavities by aspiration (washing machine) or by decantation (manual). Use approximately 300µL/well of previously diluted Wash Solution, for a total of five (5) wash cycles. Shake for three seconds after each wash cycle. To guarantee the drying of the plate, at the end of the wash, tap the plate for a few seconds on absorbent paper.

IMPORTANT: Poor washing/drying can cause inadequate results.

8- Pipette 100 µL of the Conjugate previously diluted into each well, even in the Blank cavity.

9- Homogenize gently for ± 10 seconds. Cover the cavities with plate sealer.

10- Incubate for 30 minutes at a 37 °C ± 2 °C.

11- Repeat item 7.

12- Add 100 µL of Substrate TMB into each well.

13- Homogenize gently for ± 3 seconds. Cover the cavities with plate sealer.

14- Incubate for 10 minutes at 37°C, protected from light.

15- Remove the plate sealer from the cavities.

16- Pipette 100 µL of Stop Solution into all wells.

17- Homogenize gently for ± 3 seconds

18- Read the absorbance in an ELISA reader on a dual filter 450 nm (primary filter) / 630nm (secondary filter) within a maximum of 10 minutes after adding the Stop Solution.

TECHNIQUE VERIFICATION

Verify if the results obtained from reading the Controls and the Blank are compatible with the specification above:

ITEM	ABSORBANCE (DUAL FILTER)
Blank	< 0.050
Negative Control	0.100 a 0.300
Positive Control	> 0.800

If the values are out the expected ones, the test should be repeated.

Calculations

Calculate Cut Off according to the following formula:

Cut Off = Average Negative Control Absorbance + 0.300

Example:

ITEM	ABSORBANCIA
Negative Control	A1 = 0.208
	A2 = 0.212
Cut Off = Negative Control Average Absorbance + 0.300	(0.208 + 0.212) / 2 + 0.300 = 0.510

Calculate the index by dividing the absorbance of the sample by the cut off value.

Example:

ITEM	ABSORBANCE
Sample	0.992
Negative Control	0.210
Cut Off Value	0.510
Index: Sample Abs. / Cut Off Value	0.992 / 0.510 = 1.95

INTERPRETATION OF THE RESULT

After calculating the sample index, consider the indices below to determine the results.

RESULTS	INDEX
Negative	< 0.9
Positive	> 1.1
Undetermined	≥ 0.9 y ≤ 1.1

Note: In case of an indeterminate result, the sample must be reanalyzed. Samples that repeatedly obtain indeterminate results should be retested using an alternative method. If results remain indeterminate, a new sample should be collected within two weeks. The result of the last sample collected must prevail. The results provided by this kit must be interpreted by the responsible veterinarian, and is not the only criterion for determining the diagnosis and/or treatment of the patient.

PROCEDURE LIMITATIONS

The interpretation of a diagnostic test must be performed by a qualified veterinarian and must also consider the history and clinical evaluation of the animal. Thus, a negative result does not exclude the possibility of exposure since it is influenced by several factors such as the individual immune response against the pathogen, the animal's health condition, time of exposure to the pathogen, among others.

INTERNAL QUALIT CONTROL

The Clinical Laboratory must have an internal quality control, where all procedures, rules, limits and tolerance to variations be clearly established. It is important to mention that all measurement systems present a analytical variety, and it must be monitor by the laboratory. Therefore, it is recommendable the use of controls, allowing the precision and accuracy of the dosages.

PRODUCT PERFORMANCE

ACCURACY

Repeatability

Repeatability was calculated from 10 successive determinations, using 3 samples with different values, obtaining the following results:

REPEATABILITY	ABSORBANCE		
	1	2	3
Mean	0.780	0.980	0.090
Standard Deviation	0.037	0.077	0.002
Coefficient of Variation (%)	4.730	7.800	2.604

Reproducibility

Reproducibility was calculated from 10 successive determinations over 3 consecutive days, using 3 samples with different values, obtaining the following results:

REPRODUCIBILITY	ABSORBANCE		
	1	2	3
Mean	0.780	1.000	0.093
Standard Deviation	0.050	0.049	0.005
Coefficient of Variation (%)	6.414	4.879	5.072

CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

The kit VETLISA BABESIA IgG analyzed clinical samples compared to other ELISA method. The results show that the kit VETLISA BABESIA IgG presents a clinical sensitivity of 97.4% and a clinical specificity of 97.8%.

VETLISA Babesia IgG	Method	Reference		Total
	Result	Positive	Negative	
	Positive	88	1	89
	Negative	2	37	39
Total Result		90	38	128

Clinical Sensitivity: 97.4% (37/38)

Clinical Specificity: 97.8% (88/90)

Precision: 97.7% [(88+37)/(90+38)]

CLINICAL SIGNIFICANCE

Babesiosis is caused by protozoa of the genus Babesia (*Babesia canis*, *B. gibsoni* and *B. vogeli*) that affect domestic and wild dogs and humans. Babesia is transmitted by the bite of the brown tick (*Rhipicephalus sanguineus*) during blood feeding. The incubation period between infection and the appearance of clinical signs varies between 7 and 31 days, and the infection may manifest itself in a superacute, acute, chronic or asymptomatic form. The most common clinical signs in the acute and superacute forms include anemia, thrombocytopenia, hemoglobinuria, fever, pale mucous membranes, tachycardia, tachypnea, depression, anorexia, jaundice, and splenomegaly. Chronically affected animals show weight loss and anorexia. Antibodies begin to be produced between the 1st and 3rd week after infection, and are easily detected in serological tests, aiding in the diagnosis of babesiosis. Importantly, the results obtained in the serological tests must be evaluated with caution, and in conjunction with laboratory and clinical findings, and the conclusion must be made by a veterinarian.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1- TABOADA J, MERCHANT SR. Babesiosis of Companion Animals and Man. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. n.1. v. 21, p. 103-123. Janeiro, 1991.

2- COMAZZI S, PALTRINIERI S, MANFREDI MT, AGNES F. Diagnosis of canine babesiosis by Percoll gradient separation of parasitized erythrocyties. Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation. v.11, p. 102-104. 1999.

3- BOOZER AL, MACINTIRE DK. CANINE BABESIOSIS. Vet Clin Small Anim, v.33, p.885-904, 2003.

4- BRANDÃO LP, HAGIWARA MK, MYIASHIRO SI. Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with Babesia canis and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. Vet Parasitol., v.114, p.253-265, 2003.

5- VERCAMMEN F, DE DEKEN R, MAES L. Duration of protective immunity in experimental canine babesiosis after homologous and hererologous challenge. Veterinary Parasitology, v.68, p. 51-55, 1997.

6- Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

QUALITY GUARANTEE

Before being released for consumption, all Quibasa reagents are tested by the Quality Control Department. The quality of the reagents is assured until the validity date mentioned on the packaged, as long as they are stored and transported under the appropriate conditions.



QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda.

Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel.: +55 31 3439.5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Industria Brasileira

CONSUMER SERVICE

Customer Support Service
Tel.: 0800 0315454 | E-mail: sac@bioclin.com.br

Product licensed in the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply since 10/04/2019 with the number 10.235/2019.

Technical manager: Dra. Camila Eckstein (CRMV/MG 20611)

Review: October/2022

UNIVERSAL SYMBOLOGY

	CATALOG NUMBER		MADE BY
	LOT NUMBER		CONTROL
	MANUFACTURING DATE		POSITIVE CONTROL
	VALIDITY DATE (last day of the month)		NEGATIVE CONTROL
	TEMPERATURE LIMIT (store)		BIOLOGICAL RISK
	CONTENT IS SUFFICIENT FOR <N> TEST		FLAMMABLE
	SEE INSTRUCTIONS FOR USE		CORROSIVE
	IN VITRO DIAGNOSTIC PRODUCT		TOXIC
	KEEP AWAY FROM SUNLIGHT		DO NOT USE IF PACKAGE IS DAMAGED
	DO NOT REUSE		PRODUCT STERILIZED
	CAUTION		DANGER