



# Anaplasma/Babesia/Ehrlichia Multiplex PCR

*Instruções de uso*

---

**REF** G130-4

Revisão: Maio/2025

**Biolin · QUIBASA**

# ÍNDICE

Finalidade .....	3
Princípio de Ação .....	3
Apresentação .....	3
Reagentes .....	4
Equipamentos e Insumos Operacionais .....	4
Condições de Armazenamento e Transporte .....	4
Cuidados Especiais .....	5
Amostras .....	6
Procedimento .....	6
A. Extração do DNA .....	6
B . Preparo dos Reagentes .....	7
C . Preparo da PCR .....	7
D . Definições do termociclador para a PCR em Tempo Real .....	8
E . Validação do Resultado .....	10
F . Interpretação do resultado .....	11
Limitações do Processo .....	12
Sensibilidade Analítica .....	12
Significado Clínico .....	12
Referências Bibliográficas .....	12
Atendimento ao Consumidor .....	13
Simbologia Universal .....	15

## FINALIDADE

Teste para detecção qualitativa do DNA de espécies do gênero Anaplasma, do gênero Ehrlichia e de Babesia (Mammalian babesiosis) em amostras biológicas através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Produto de uso exclusivo em Pesquisa (**RUO – Research Use Only**). Para outras finalidades, seguir as orientações preconizadas nas legislações aplicáveis.

## PRINCÍPIO DE AÇÃO

O kit **Bio Gene Vet Anaplasma/Babesia/Ehrlichia Multiplex PCR** é um ensaio *in vitro* baseado na detecção qualitativa do DNA de Anaplasma spp, Ehrlichia spp e de Babesia (*Mammalian babesiosis*) através da PCR em tempo real. O método de PCR em Tempo Real é usado para amplificar o DNA patógeno. Um termociclador de PCR em Tempo Real é usado para amplificar e detectar as sondas fluorescentes específicas para cada patógeno. O software do aparelho detecta a presença ou ausência dos patógenos.

Reagente	Apresentação
	Bio Gene Vet Anaplasma/Babesia/ Ehrlichia Multiplex PCR
	100 Testes
R1	1 x 110 µL*
R2	1 x 1,1 mL*
R3	1 x 1,5 mL
R4	1 x 500 µL*
R5	1 x 1,5 mL
R6	1 x 1,5 mL
R7	1 x 500 µL*

\*Reagentes liofilizados. Os volumes descritos acima correspondem ao volume final após a ressuspensão dos reagentes, conforme descrito no item PROCEDIMENTO, subitem B. (Preparo dos Reagentes).

## REAGENTES

- R1. Solução PCR:** Primer, Sonda, TRIS-HCl.
- R2. Mix Taq:** Polimerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Estabilizantes.
- R3. Tampão Mix:** TRIS-HCl.
- R4. Controle Positivo:** Plasmídeo, TRIS-HCl, EDTA.
- R5. Diluente:** TRIS-HCl, EDTA.
- R6. Água:** Água livre de DNase/RNase.
- R7. Controle Interno:** Plasmídeo, TRIS-HCl, EDTA.

\* O **R1** contém Primers e Sondas para os patógenos e para o Controle Interno.

## EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

### Materiais contidos no kit:

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

### Materiais necessários, mas não contidos no kit:

- 1- Sistema ótico programável de detecção de fluorescência (Termociclador Real-time PCR);
- 2- Capela de fluxo laminar;
- 3- Tubos de centrifuga de 1,5 mL;
- 4- Tubos ou placas para PCR;
- 5- Luvas de látex descartáveis livres de pó ou material similar;
- 6- Microcentrífuga;
- 7- Vórtex;
- 8- Micropipetas e ponteiros estéreis com filtro (0,5-10µL, 10-100µL, 100-1000µL);
- 9- Kit para extração de ácidos nucleicos;

## CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento é de -20°C (-10 a -30°C).

**Após a ressuspensão dos reagentes liofilizados, o produto é estável por 6 meses a partir da data de ressuspensão.**

Deve-se evitar o congelamento e descongelamento. O transporte pode ser feito em temperaturas entre 2 e 30°C por 7 dias. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

### **CUIDADOS ESPECIAIS**

**1-** Produto de uso exclusivo em Pesquisa (**RUO – Research Use Only**). Para outras finalidades, seguir as orientações preconizadas nas legislações aplicáveis.

**2-** Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos;

**3-** Manusear e descartar todas as amostras biológicas, reagentes e materiais utilizados para realização do ensaio como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite contato direto com as amostras biológicas e os reagentes. Evitar derrames ou aerossol. Os resíduos devem ser manuseados e descartados de acordo com as medidas de segurança adequadas.

**4-** Procedimentos de biologia molecular, tais como a extração de ácidos nucleicos, transcrição reversa, amplificação e detecção requerem pessoal qualificado para evitar o risco de resultados errados, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos contidos nas amostras ou contaminação da amostra por produtos de amplificação.

**5-** É necessário dispor de áreas separadas para a extração/preparação de reações e para a amplificação/detecção de produtos. Nunca introduzir um produto de amplificação na área destinada para a extração ou preparação de produtos de amplificação.

**6-** Todas as amostras e reagentes devem ser manipulados sob uma capela de fluxo laminar. As pipetas devem ser usadas com ponteiros com filtro. As ponteiros empregadas devem ser estéreis, livres de DNases e RNases.

**7-** Evitar o congelamento e descongelamento repetido dos reagentes.

**8-** Armazenar as amostras de DNA a -20°C, caso não forem utilizadas imediatamente.

**9-** Não usar o kit após a data de validade.

**10-** 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.

**11-** Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FDS (Ficha com Dados de Segurança) disponibilizadas no site [www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br) ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.

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

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

## AMOSTRAS

Este kit deve ser utilizado com amostras de DNA extraídas de sangue. Outros tipos de amostra podem ser utilizados de acordo com recomendações médicas ou do próprio laboratório.

As amostras devem ser coletadas de acordo com as recomendações do laboratório para testes moleculares. Devem ser transportadas e armazenadas entre 2 e 8°C por até 3 dias<sup>1</sup>.

Utilizar amostras de DNA adequadas à amplificação por PCR com pureza e concentração adequadas. Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido.

## PROCEDIMENTO

### A. Extração do DNA

Os ácidos nucleicos (DNA) das amostras devem ser extraídos seguindo as instruções de uso do kit escolhido. Para o controle do processo de extração, o **Controle Interno (R7)** deve ser preparado (vide item B.4) e adicionado às amostras durante a extração, conforme descrito abaixo:

**1-** Adicionar 5µL do **Controle Interno (R7)** a cada tubo contendo as amostras já ressuspendidas em tampão de extração / lise.

2- Completar o processo de extração de acordo com as instruções de uso do kit de extração.

**OBS.:** Nunca adicionar o **Controle Interno (R7)** diretamente à amostra biológica pura, pois pode resultar em degradação do mesmo.

### **B. Preparo dos reagentes**

Os reagentes **R4** e **R7** contém molde de DNA, e eles devem ser manipulados (ressuspendido) em área apropriada para evitar a contaminação dos demais reagentes.

- 1- Centrifugar (pulso spin) os reagentes **Solução PCR (R1)**, **Controle Positivo (R4)** e **Controle Interno (R7)** antes da abertura dos microtubos.
- 2- Ressuspender o reagente **Mix Taq (R2)\*** com 1,1 mL do reagente **Tampão Mix (R3)**.

*\*O **Mix taq (R2)** não contém fluoróforo de referência passiva (ROX).*

3- Ressuspender os reagentes, **Solução PCR (R1)** com 110 µL do reagente **Água (R6)**.

4- Ressuspender os reagentes **Controle Positivo (R4)** e **Controle Interno (R7)** com o reagente **Diluente (R5)** de acordo com a tabela abaixo

Reagente	Apresentação
	100 Testes
Controle Positivo (R4)	500 µL
Controle Interno (R7)	500 µL

### **C. Preparo da PCR**

1- Separar previamente os microtubos/poços a serem utilizados, de acordo com o número de amostras e controles a serem analisados.

2- Preparar o volume da solução de PCR final de acordo com o número de reações a ser realizadas.

Reagentes	1 Reação	25 Reações	50 Reações	100 Reações
Mix Taq (R2)	10 $\mu$ L	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L	1mL
Solução PCR (R1)	1 $\mu$ L	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L

Para o preparo de número de reação diferente deve-se multiplicar o volume dos reagentes para 1 reação pelo número de reações necessárias.

3- Pipetar 11 $\mu$ L da solução de PCR final nos tubos ou poços determinados para as reações.

4- Adicionar 9 $\mu$ L do DNA extraído da amostra ou 9 $\mu$ L do **Controle Positivo (R4)** ou 9 $\mu$ L de **Água (R6)**, usada como controle negativo.

5- Homogeneizar bem.

6- Observe que o volume total da reação é de 20 $\mu$ L, e cada corrida de PCR deve incluir os controles relevantes (Controle Negativo, Controle Positivo).

7- Homogeneizar bem.

8- Transporte os tubos/placa para o termociclador.

#### ***D. Definições do termociclador para a PCR em Tempo Real***

Verificar o manual de operação do equipamento de PCR em tempo real para a programação do experimento.

#### **1- Defina o tipo de experimento:**

Teste Qualitativo.

## 2- Defina os detectores (sondas) fluorescentes como:

**OBS.:** Equipamentos que utilizam o ROX como referência passiva deve ser programado com a opção “NONE” para referência passiva.

Alvo	Detector	Quencher
Ehrlichia spp	VIC	NFQ-MGB
Babesia	ROX	
Anaplasma spp	FAM	
Controle Interno	Cy5	

**OBS:**

- O Controle Positivo não apresenta o Controle Interno (Cy5), pois o mesmo é utilizado para o controle da extração e da amplificação das amostras.
- As amostras extraídas devem ser marcadas com os detectores VIC, ROX, FAM e Cy5.

## 3- Defina as condições dos ciclos:

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	95°C	3 minutos	1
2	95°C	15 segundos	45
	60°C	60 segundos	

Defina “Data Collection” como “stage 2, step 2 (60@0:60)”.

## E. Validação do Resultado

### 1- Controles

Controles	Faixa permitida CT	Amplificação/Detecção
Positivo (FAM, VIC e ROX)	16 - 21	Válida
Negativo	Indeterminado	Válida
Interno (Cy5)	$25 \leq CT \leq 35$	Válida

**Obs:** Os valores de CT do Controle Interno variam de acordo com as condições do processo, como a eficiência da extração do DNA/RNA, a concentração das amostras e as configurações do termociclador. Logo, estas condições devem ser avaliadas quando os valores de CT não forem adequados e, se pertinente, os resultados podem ser validados.

**Exemplo:** Amostras com alto número de cópias de DNA/RNA podem, em alguns casos, inibir a amplificação do Controle Interno resultando em valor de CT fora da faixa ideal, este resultado não invalida o teste.

Se os requisitos acima não forem cumpridos, o ensaio é considerado inválido e o teste deve ser repetido.

## F. Interpretação do resultado

Anaplasma/Babesia/Ehrlichia				Resultado
VIC	ROX	FAM	CY5	
<b>CT Determinado</b>	CT Indeterminado	CT Indeterminado	<b>CT Determinado</b>	Positivo - Ehrlichia spp
CT Indeterminado	<b>CT Determinado</b>	CT Indeterminado	<b>CT Determinado</b>	Positivo - Babesia
CT Indeterminado	CT Indeterminado	<b>CT Determinado</b>	<b>CT Determinado</b>	Positivo - Anaplasma spp
CT Indeterminado	CT Indeterminado	CT Indeterminado	<b>CT Determinado</b>	Negativo - Ehrlichia spp, Anaplasma spp, Babesia

Determinado: presença de curva de amplificação / Indeterminado: ausência de curva de amplificação.

**Obs:** Pode ocorrer amplificação de curva (CT determinado) para mais de um patógeno, neste caso trata-se de uma coinfeção. O resultado é válido desde que todos os controles apresentem valores entre os limites de faixa permitida e que o aspecto da curva da amostra testada seja semelhante as curvas obtidas no **Controle Positivo (R4)**, com forma sigmóide.

O kit é capaz de detectar de 10 a 1.000.000 de cópias por reação.

A não detecção do DNA do patógeno não exclui a presença de infecção quando o título do patógeno estiver abaixo do limite de detecção deste kit.

Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

Os resultados obtidos devem ser avaliados considerando os dados clínicos e os exames laboratoriais do paciente.

### Limitações do Processo

Contaminações cruzadas que ocorrem durante a coleta da amostra, processamento, transporte e armazenamento poderão ocasionar resultados falsos.

### Sensibilidade Analítica

A técnica foi capaz de detectar aproximadamente 2 moléculas alvo em 9µL do produto de extração de DNA adicionado a reação de amplificação.

**OBS:** A sensibilidade analítica do produto pode sofrer interferência de fatores como a eficiência do kit/método utilizado para a extração dos ácidos nucléicos, e a sensibilidade do equipamento termociclador em tempo real usado.

### Significado Clínico

As espécies dos gêneros *Anaplasma* e *Ehrlichia*, que causam a anaplasmosose e a erlichiose respectivamente, são bactérias Gram-negativas intracelulares obrigatórias pertencentes à ordem Rickettsiales. Já a babesia é causada por parasitas intraeritrocítico apicomplexo da família Babesiidae, como *Mammalian babesiosis*. Estes patógenos podem infectar animais selvagens, domésticos e até humanos, a transmissão ocorre principalmente através de vetores artrópodes como o carrapato.

Nos cães, a anaplasmosose e a erlichiose podem causar infecções subclínicas até infecções persistentes, os sinais clínicos mais comuns são febre, letargia, anorexia, vômito, mucosas pálidas, epistaxe, esplenomegalia e linfadenomegalia. Já a babesia, pode causar trombocitopenia, anemia, esplenomegalia, febre podendo resultar na morte do animal.

Devido a similaridade dos sintomas causados pelas doenças, a detecção qualitativa dos patógenos por PCR em tempo real, tem grande importância por ser um método sensível, preciso e ágil.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baneth G, Harrus S, Ohnona FS, Schlesinger Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. *Vet Microbiol.* 2009;136(3-4):321-5.
2. Barrantes-González AV, Jiménez-Rocha AE, Romero-Zuñiga JJ, Dolz G. Serology, molecular detection and risk factors of *Ehrlichia canis* infection in dogs in Costa Rica. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7(6):1245-1251.
- 3- Battilani M, De Arcangeli S, et al. Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. *Infect Genet Evol.* 2017 Apr;49:195-211.

4. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
- 5- Eddlestone SM, Gaunt SD, et al. PCR detection of Anaplasma platys in blood and tissue of dogs during acute phase of experimental infection. Exp Parasitol. 2007 Feb;115(2):205-10.
6. Ismail N, McBride JW. Tick-Borne Emerging Infections: Ehrlichiosis and Anaplasmosis. Clin Lab Med. 2017;37(2):317-340.2017;7;10(1):128.
7. Qurollo BA, Archer NR, Schreeg ME, et al. Improved molecular detection of Babesia infections in animals using a novel quantitative realtime PCR diagnostic assay targeting mitochondrial DNA. Parasit Vectors. 2017;7;10(1):128.
8. Souza SS, Bishop HS, Sprinkle P, et al. Comparison of Babesia microti Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays for Confirmatory Diagnosis of Babesiosis. Am J Trop Med Hyg. 2016;7;95(6):1413-141

**QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda**

Rua Teles de Menezes, 92 – Santa Branca  
CEP 31565-130 – Belo Horizonte – MG – Brasil  
Tel.: (31) 3439.5454  
E-mail: [sac@bioclin.com.br](mailto:sac@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](mailto:sac@bioclin.com.br)



## SIMBOLOGIA UNIVERSAL

	NÚMERO DE CATÁLOGO		FABRICADO POR
	NÚMERO DO LOTE		CONTROLE
	DATA DE FABRICAÇÃO		CONTROLE POSITIVO
	DATA DE VALIDADE (último dia do mês)		CONTROLE NEGATIVO
	LIMITE DE TEMPERATURA (conservar a)		RISCO BIOLÓGICO
	O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTE		INFLÂMVEL
	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CORROSIVO
	PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PROTEGER DA LUZ E CALOR		NÃO UTILIZAR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA
	NÃO REUTILIZE		PRODUTO ESTERELIZADO
	CUIDADO		PERIGO



## **Bioclin · QUIBASA**



Rua Teles de Menezes, 92 . Belo Horizonte . MG . Brasil . CEP: 31565-130

Tel +55 31 3439 5454 . [www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br)

FARM. RESP. Silvio Wandalsen Arndt - CRF MG 7422

C.N.P.J.: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira