

VETLISA BABESIA IgM



INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE

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

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou ensaio imunoenzimático. O VETLISA BABESIA IgM é um ensaio imunoenzimático em fase sólida, baseado no princípio de imunocaptura para a detecção qualitativa de anticorpos IgM contra *Babesia canis* em soro ou plasma de cães. Anticorpos contra *Babesia canis* presentes na amostra se ligam aos antígenos recombinantes de *Babesia canis* que revestem a microplaca, formando imunocomplexos antígeno-anticorpo imobilizados. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os excedentes. Após esta etapa, o Substrato é adicionado e incubado, produzindo uma cor azul, que indica a presença de anticorpos IgM contra *Babesia canis*. A Solução de Parada é adicionada para interromper a reação, promovendo uma mudança de cor de azul 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: Anticorpo anti-IgM de cão conjugado à peroxidase e estabilizante de proteína.
- 3- Lavagem Concentrada (20x)** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução tampão, surfactante e conservante
- 4- Diluente** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução tampão, estabilizantes, corante, surfactante e conservante
- 5- Substrato TMB** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução contendo 3, 3', 5, 5' - tetrametilbenzidina (TMB), peróxido de uréia e conservante.
- 6- Solução de Parada** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução de Ácido Sulfúrico 1 mol/L.
- 7- Controle Negativo** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Soro negativo para anticorpos IgM contra *Babesia canis* e estabilizante de proteína. **Potencialmente infectante.**
- 8- Controle Positivo** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Soro positivo para anticorpos IgM contra *Babesia canis* e estabilizante de proteína. **Potencialmente infectante.**
- 9- Seladores de Placa**

APRESENTAÇÃO

Componentes	Apresentação			
	1	2	3	4
	96 cavidades	192 cavidades	480 cavidades	960 cavidades
1- Placa Sensibilizada	1 unidade	2 unidades	5 unidades	10 unidades
2- Conjugado Concentrado	1 x 300 µL	2 x 300 µL	5 x 300 µL	10 x 300 µL
3- Lavagem Concentrada	1 x 50 mL	2 x 50 mL	5 x 50 mL	10 x 50 mL
4- Diluente	1 x 60 mL	2 x 60 mL	5 x 60 mL	10 x 60 mL
5- Substrato TMB	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL	10 x 15 mL
6- Solução de Parada	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL	10 x 15 mL
7-Controle Negativo	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL	10 x 1 mL
8- Controle Positivo	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL	10 x 1 mL
9-Seladores de Placa	3 unidades	6 unidades	15 unidades	30 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 nm 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 do produto é de 2 a 8°C. O transporte pode ser feito sob temperatura ambiente (até 30°C) por até 5 dias. Manter ao abrigo da 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- Não misture reagentes de kits ou lotes diferentes. Não utilize componentes do kit vencidos.
- 7- Não coma, beba ou fume no local de realização do ensaio.
- 8- Não pipete reagentes ou amostra(s) utilizando a boca. Não utilize a mesma ponteira para pipetar diferentes amostras.
- 9- Os Controles Positivo e Negativo devem ser retestados para cada novo ensaio realizado.
- 10- A Solução de Parada contém Ácido Sulfúrico que é um ácido forte. Portanto, manuseá-lo com devido cuidado.
- 11- O profissional deve seguir com rigor as normas e rotinas de segurança ao manipular amostras biológicas. O uso de luvas descartáveis e outros equipamentos de proteção individual é imprescindível.
- 12- Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.
- 13- Por medida de proteção, deve-se cobrir a placa durante a reação.
- 14- 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.
- 15- Manusear os componentes do kit com o devido cuidado, a fim de evitar sua contaminação. Utilize ponteiras e recipientes novos ou adequadamente limpos para seu manuseio e não exponha os reagentes, especialmente o Substrato, à luz forte ou vapores de Hipoclorito durante o armazenamento ou etapas de incubação.
- 16- 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.
- 17- 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.
- 18- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.
- 19- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

AMOSTRAS

Soro ou Plasma (EDTA ou Heparina).

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 IgM é estável após aberto durante, pelo menos, 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.

Preparo dos Reagentes de Trabalho

SOLUÇÃO DE LAVAGEM

Diluir o conteúdo da Lavagem Concentrada (Reagente Nº 3) em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Após o preparo, a solução pode ser estocada entre 2 a 30 °C até a data de validade impressa no frasco original. Pode ser armazenada em temperatura ambiente. Caso ocorra cristalização, aquecer a 37°C até dissolução.
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 necessária para realizar o ensaio.

DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS

Em um tubo de ensaio, diluir 15 µL da amostra em 300 µL de Diluente, 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.

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

SUBSTRATO

O Substrato é pronto para o uso.

Técnica

- Antes de iniciar o ensaio, colocar todos os reagentes, amostras e controles para estabilizarem em temperatura ambiente (15 – 30 °C) por no mínimo 40 minutos.
- 1- Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Controles e Amostras (recomenda-se testar em duplicata). Retornar as tiras não utilizadas da microplaca para a embalagem original selada.
- 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 (OPCIONAL), caso tenha feito a opção, pipetar somente 100 µL do diluente.
- 5- Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cobrir as cavidades com selador de placas.
- 6- Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37°C ± 2°C.
- 7- Retirar o selador das cavidades.
- 8- Descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (Lavadora) ou por decantação (Manual).
- Usar 300 µL aproximadamente de Solução de Lavagem, previamente preparada, e efetuar um total de cinco (5) ciclos de lavagem. Agitar por 3 segundos em cada lavagem. Para a garantia da secagem da placa, ao final da lavagem, bater a placa por alguns segundos em papel absorvente.
- Nota:** Lavagem/secagem deficiente pode causar resultados inadequados.
- 9- Pipetar 100 µL de Conjugado previamente diluído em todas as cavidades.
- 10- Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.
- 11- Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37°C ± 2°C.
- 12- Retirar o selador de placa das cavidades.
- 13- Repetir o item 8.
- 14- Pipetar 100 µL de Substrato em todas as cavidades.
- 15- Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.
- 16- Incubar por 10 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37°C ± 2°C.

- 17-** Retirar o selador de placa das cavidades.
- 18-** Pipetar 100 µL de Solução de Parada em todas as cavidades.
- 19-** Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos.
- 20-** Ler utilizando filtro duplo: 450 nm / 630 nm em até 15 minutos (no máximo).

VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

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

ITEM	ABSORBÂNCIA (FILTRO DUPLO)
Branco	< 0,100
Controle Negativo	0,100 a 0,300
Controle Positivo	> 1,000

Caso os valores se encontrem fora dos valores esperados, deve-se repetir a técnica.

Cálculos

QUALITATIVO

Calcular Cut Off de acordo com a seguinte fórmula:

Cut Off = Absorbância média do Controle Negativo + 0,450
--

Exemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Controle Negativo	0,212
	0,208
Cut-Off = Absorbância Média do Controle Negativo + 0,450	((0,212 + 0,208) / 2) + 0,450 = 0,660

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

ITEM	ABSORBÂNCIA
Amostra	1,680
Valor de Cut Off	0,660
Índice = Amostra / Valor de Cut Off	1,680 / 0,660 = 2,55

INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO

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

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

Observação: 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 permanecerem 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 responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

Nota: Os dados apresentados nos exemplos são apenas para ilustração e não podem ser usadas para cálculo dos resultados.

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

A interpretação de um teste diagnóstico, não deve ser estabelecida com base em um único ensaio. Devem-se incluir outros testes de confirmação, antes que uma amostra seja considerada positiva. Um resultado negativo não exclui a possibilidade de exposição. Os resultados devem ser interpretados por médico veterinário

habilitado em conjunto com outras informações clínicas disponíveis antes do diagnóstico definitivo da doença.

INTERFERENTES

Nenhuma interferência foi observada por Triglicérides 1500 mg/dL, ÁcidoAscórbico 2g/dL, Creatina200mg/dL, Bilirrubina 1 g/dL, Albumina 2 g/dL, Hemoglobina 1000 mg/dL, Ácido Oxálico 60 mg/dL, Fator Reumatóide 980 UI/mL, Proteína C Reativa 41,2 mg/dL e Anti-Estreptolisina O 1023 UI/mL.

REATIVIDADE CRUZADA

Um estudo de reatividade cruzada foi realizado, avaliando 45 amostras negativas para anticorpos IgM contra *Babesia canis*, mas positivas para outras infecções. Foram testadas 12 amostras positivas para Brucelose, 2 amostras positivas para Anaplasmosse, 19 amostras positivas para Cinomose, 3 amostras positivas para Parvovirose e 9 amostras positivas para Eriquiose. Não foi observada reatividade cruzada com nenhuma das amostras. Apesar dos resultados encontrados, não se pode descartar completamente a possibilidade de reatividade cruzada. O diagnostico final deve considerar os dados clínicos do paciente juntamente com outros dados laboratoriais e clínicos.

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 permitam 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. Foram obtidos os seguintes resultados:

REPETIBILIDADE	ABSORBÂNCIA		
	1	2	3
Média	2,903	0,438	0,147
Desvio Padrão	0,090	0,022	0,005
Coefficiente de Variação (%)	3,07	5,01	4,03

REPRODUTIBILIDADE

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas durante 3 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com valores diferentes. Foram obtidos os seguintes resultados:

REPRODUTIBILIDADE	ABSORBÂNCIA		
	1	2	3
Média	2,864	0,413	0,147
Desvio Padrão	0,136	0,026	0,008
Coefficiente de Variação (%)	4,73	6,36	5,72

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

No VETLISA BABESIA IgM, foram analisadas amostras clínicas em comparação com outro método de Enzimaimunoensaio. Os resultados mostram que a sensibilidade clínica do kit é 95,7% e a especificidade clínica é de 96,1%.

VETLISA BABESIA IgM	Método	Referência		Total
	Resultado	Positivo	Negativo	
	Positivo	22	2	24
	Negativo	1	51	52
Resultado Total		23	53	76

Sensibilidade Clínica: 95,7% (22/23) - IC 95%: 87,5% - 100%
Especificidade Clínica: 96,1% (51/53) - IC 95%: 90,9% - 100%
Precisão: 96,0% [(22+51) / (23+53)]

SIGNIFICADO CLÍNICO

A babesiose é causada por protozoários do gênero *Babesia*, que acometem os cães são transmitidos pela picada do carrapato marrom (*Rhipicephalus sanguineus*). O período de incubação da babesiose varia entre 7 e 31 dias, podendo a infecção se manifestar de forma superaguda, aguda, crônica ou assintomática. Os sinais clínicos mais comuns incluem anemia, trombocitopenia, hemoglobinúria, febre, mucosas pálidas, taquicardia, taquipneia, depressão, anorexia e esplenomegalia, e em cães que apresentam a forma crônica da doença geralmente apresentam perda de peso e anorexia. Durante a infecção o corpo produz anticorpos que auxiliam no combate do patógeno e são uma ferramenta de diagnóstico eficaz para indicar a infecção. A primeira classe de anticorpos produzida é a imunoglobulina M (IgM), que aparece entre a 1ª e a 3ª semana após a infecção. A detecção da classe IgM indica a infecção recente, e permite identificar a infecção em sua fase inicial, favorecendo o tratamento e o controle da doença.

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 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 heterologous challenge. Veterinary Parasitology, v.68, p. 51-55, 1997.
- 6- QUIBASA: 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 03/03/2022 sob o número 10.490/2022.

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

Revisão: Abril/2022

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		INFLAMAVEL
	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

VETLISA BABESIA IgM



INSTRUCCIONES DE USO

FINALIDAD

Prueba para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM contra *Babesia canis* en suero o plasma de perros, mediante ensayo inmunoenzimático, en microplaca. Solamente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodología: Enzimaimunoensayo o inmunoenzimático
El VETLISA BABESIA IgM es un ensayo inmunoenzimático en fase sólida, basado en el principio de inmunocaptura para la detección cualitativa de anticuerpos IgM contra *Babesia canis* presentes en la muestra se unen a los antígenos recombinantes de *Babesia canis* que recubren la microplaca, formando inmunocomplejos antígeno-anticuerpo inmovilizados. Después de la incubación inicial, la microplaca se lava para eliminar los materiales no unidos. El conjugado, formado por un anticuerpo IgM anti-perro ligado a la peroxidasa, se agrega y se une a los anticuerpos IgM ligados a los antígenos inmovilizados en la placa. Después de una segunda incubación, la microplaca se lava para eliminar el exceso. Después de esta etapa, se agrega e incuba el Sustrato, produciendo un color azul, que indica la presencia de anticuerpos IgM contra *Babesia canis*. La solución de parada se agrega para detener la reacción, promoviendo un cambio de color de azul 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, impregnadas con antígeno recombinante de *Babesia canis*.
- 2- Conjugado Concentrado (100X)** - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Anticuerpo anti-IgM de perro conjugado a peroxidasa y estabilizador de proteínas.
- 3- Lavado Concentrado (20X)** - Almacenar entre 2 y 8 °C. Contiene: Solución tamponada, surfactante y conservante.
- 4- Diluyente** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução tampão, estabilizantes, corante, surfactante e conservante
- 5- Sustrato TMB** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução contendo 3, 3', 5, 5' - tetrametilbenzidina (TMB), peróxido de uréia e conservante.
- 6- Solución de Parada** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Solução de Ácido Sulfúrico 1 mol/L.
- 7- Control Negativo** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Soro negativo para anticorpos IgM contra *Babesia canis* e estabilizante de proteína. **Potencialmente infectante.**
- 8- Control Positivo** - Armazenar entre 2 e 8°C. Contém: Soro positivo para anticorpos IgM contra *Babesia canis* e estabilizante de proteína. **Potencialmente infectante.**
- 9- Selladores de Placa**

PRESENTACIONES

Componentes	PRESENTACIÓN			
	1	2	3	4
	96 cavidades	192 cavidades	480 cavidades	960 cavidades
1- Placa Sensibilizada	1 unidad	2 unidades	5 unidades	10 unidades
2- Conjugado Concentrado	1 x 300 µL	2 x 300 µL	5 x 300 µL	10 x 300 µL
3- Lavagem Concentrada	1 x 50 mL	2 x 50 mL	5 x 50 mL	10 x 50 mL
4- Diluyente	1 x 60 mL	2 x 60 mL	5 x 60 mL	10 x 60 mL
5- Sustrato TMB	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL	10 x 15 mL
6- Solución de Parada	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL	10 x 15 mL
7- Control Negativo	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL	10 x 1 mL
8- Control Positivo	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL	10 x 1 mL
9- Selladores de Placa	3 unidades	6 unidades	15 unidades	30 unidades

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONALES

Materiales contenidos en el kit:
- Reactivos descritos en el cuadro anterior.
- Instrucciones de uso (manual).

- Materiais necessários, não contidos no 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- Lectora 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 de 10-37 °C ± 2 °C.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE
La temperatura de almacenamiento del producto es de 2 a 8 °C. El transporte se puede realizar a temperatura ambiente (hasta 30 °C) durante un máximo de 5 días. Mantener al abrigo de la luz y evitar la humedad. **No congelar.**

CUIDADOS ESPECIALES

- 1- Solamente para el uso veterinario de diagnóstico *in vitro* profesional.
- 2- Seguir con rigor la metodología propuesta para la obtención de resultados exactos
- 3- El sobre de aluminio conteniendo la microplaca debe ser abierto solamente después de alcanzar la temperatura ambiente. Recolocarlo las tiras de microcavidades no utilizadas en el sobre de aluminio, sellar y almacenar de 2 a 8 °C.
- 4- El agua utilizada en la limpieza del material debe ser reciente y exenta de contaminantes.

- 5- Columnas deionizadoras saturadas liberan agua alcalina, iones diversos y agentes oxidantes y reductores que pueden alterar de forma significativa los resultados.
- 6- No mezcle reactivos de diferentes kits o lotes. No utilice componentes del kit vencidos.
- 7- No coma, beba o fume en el lugar de la prueba.
- 8- No pipetear reactivos o muestra (s) con la boca. No utilice la misma punta para pipetear diferentes muestras.
- 9- Los controles positivo y negativo deben volver a probarse para cada nueva prueba realizada.
- 10- La solución de parada contiene ácido sulfúrico, que es un ácido fuerte. Por tanto, manipúlelo con el debido cuidado.
- 11- El profesional debe seguir estrictamente las normas y rutinas de seguridad al manipular muestras biológicas. El uso de guantes desechables y otros equipos de protección personal es esencial.
- 12- Pipetear los reactivos siempre en el mismo orden para minimizar la diferencia en el tiempo de reacción entre los pocillos.
- 13- Como medida de protección cubrir la placa durante la reacción.
- 14- 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 la prueba.
- 15- Manipule los componentes del kit con el debido cuidado para evitar la contaminación. Utilice puntas y recipientes nuevos o debidamente limpios para manipularlos y no exponga los reactivos, especialmente el sustrato, a luz intensa o vapores de hipoclorito durante los pasos de almacenamiento o incubación.
- 16- Se recomienda aplicar las normas de protección ambiental locales, estatales y federales para que los reactivos y material biológico se eliminen de acuerdo con la legislación vigente.
- 17- Para obtener información relacionada con la bioseguridad o en caso de accidentes con el producto, consultar la MSDS (Ficha de Información de Seguridad para Productos Químicos) disponible en el sitio web www.bioclin.com.br o a solicitud del SAC (Servicio de Atención al Cliente) de Quibasa.
- 18- No utilice el producto en caso de daños en el embalaje.
- 19- Es fundamental que los instrumentos y equipos utilizados estén debidamente calibrados y sometidos a un mantenimiento periódico.

MUESTRAS

Suero o Plasma (EDTA o Heparina).
Las muestras pueden mantenerse 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 -20°C.

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

Estabilidad Después de Abrir
Los resultados de la prueba de estabilidad muestran que el kit VETLISA Babesia IgM es estable después de abrir durante al menos 30 días. Esta estabilidad puede variar según las condiciones de la prueba y el medio ambiente. Por lo tanto, se sugiere controlar el rendimiento del producto utilizando controles internos del kit y criterios de validación técnica.

Preparo de los Reactivos de Trabajo
SOLUCIÓN DE LAVADO
Diluir el contenido del Lavado Concentrado (Reactivo N° 3) en 1000 mL de agua destilada o desionizada. Una vez preparada, la solución se puede conservar entre 2 y 30 °C hasta la fecha de validez impresa en el frasco original. Puede almacenarse a temperatura ambiente. Si ocurre cristalización, calentar a 37°C hasta que se disuelva.

SOLUCIÓN DE CONJUGADO
Diluya el Conjugado Concentrado (Reactivo N° 2) en la proporción de 1: 101 en Diluyente (Reactivo N° 4). Prepare la solución al realizar la prueba.
Para realizar una prueba usando todos los pocillos del kit, mezcle 110 µL del Conjugado Concentrado en 11 mL de Diluyente. Para realizar un ensayo con 8 pocillos (1 tira), mezcle 10 µL de conjugado concentrado en 1 ml de diluyente.
IMPORTANTE: La solución de conjugado diluida no se puede almacenar. Por lo tanto, prepare solo la cantidad necesaria para realizar la prueba.

DILUCIÓN DE MUESTRAS

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

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

SUSTRATO
El Sustrato está listo para su uso.

- Técnica**
Antes de comenzar el ensayo, colocar todos los reactivos, muestras y controles para estabilizarse a temperatura ambiente (15 - 30°C) durante al menos 40 minutos
- 1- Separar las cavidades a ser utilizadas considerando: Controles y Muestras (se recomiendan pruebas duplicadas). Retornar las tiras de la microplaca que no serán utilizadas para el embalaje original sellado.
 - 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. **Obs: Los están listos para usar, no hay necesidad de diluirlos.**
 - 4- Pipetear 100 µL de las muestras previamente diluidas en los pocillos previamente determinadas. El la cavidad Branco (OPCIONAL), si ha elegido, pipetear solo 100 µL del diluyente.
 - 5- Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cubrir las cavidades con sellador de placas.
 - 6- Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37°C ± 2°C.
 - 7- Retirar el sellador de las cavidades.
 - 8- Desechar el contenido de las cavidades por aspiración (Lavadora) o por decantación (Manual). Usar 300 µL aproximadamente de Solución de Lavado, previamente preparada, e efectuar un total de cinco (5) ciclos de lavado. Agitar durante 3 segundos con cada lavado. Para la garantía del secado da placa, al final del lavado, batir la placa por algunos segundos em papel absorbente.
 - Nota:** Lavado/secado deficiente puede causar resultados inadecuados.
 - 9- Pipetear 100 µL de Conjugado previamente diluido en todos los pocillos.
 - 10- Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cubrir las cavidades con sellador de placas.
 - 11- Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos em una incubadora a 37°C ± 2°C.
 - 12- Retirar el sellador de las cavidades.
 - 13- Repetir el ítem 8.
 - 14- Pipetear 100 µL de Sustrato en todas las cavidades.
 - 15- Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos. Cubrir las cavidades con sellador de placas.

16- Incubar durante 10 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37°C ± 2°C.

17- Retirar el sellador de las cavidades.

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

19- Homogeneizar gentilmente durante ± 10 segundos.

20- Leer utilizando filtro doble: 450 nm / 630 nm en hasta 15 minutos (máximo).

Verificación de la Técnica

Verifique si los resultados obtenidos para lectura do Blanco y dos Controles son compatibles con los valores presentados abajo:

ITEM	ABSORBANCIA (FILTRO DUPLO)
Blanco	< 0,100
Control Negativo	0,100 a 0,300
Control Positivo	> 1,000

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

Cálculos

CUALITATIVO

Calcule el corte según la siguiente fórmula:

Cut Off = Absorbancia Promedio del Control Negativo + 0,450

Ejemplo:

ITEM	ABSORBANCIAS
Control Negativo	0,212
	0,208
Cut-Off = Absorbancia Promedio del Controle Negativo + 0,450	((0,212 + 0,208) / 2) + 0,450 = 0,660

Calcular el Índice dividiendo la absorbancia de la muestra por el valor de Cut Off. Ejemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Muestra	1,680
Valor del Cut Off	0,660
Índice = Muestra / Valor del Cut Off	1,680 / 0,660 = 2,55

INTERPRETACIÓN DO RESULTADO

Después del cálculo del índice de las muestras, considerar los índices abajo para la determinación de los resultados.

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

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

Nota: Los datos presentados en los ejemplos son solo ilustrativos y no se pueden utilizar para calcular los resultados.

LIMITACIONES DEL PROCESO

La interpretación de un test diagnóstico, no debe ser establecida con base en un sólo ensayo. Se deben incluir otros testes de confirmación, antes que una muestra sea considerada positiva. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición. Los resultados deben ser interpretados por un veterinario calificado junto con otras informaciones clínicas disponibles antes del diagnóstico descriptivo de la enfermedad.

INTERFERENTES

No se observó interferencia para Triglicéridos 1500 mg/dL, Ácido Ascórbico 2 g/dL, Creatina 200 mg/dL, Bilirrubina 1 g/dL, Albumina 2 g/dL, Hemoglobina 1000 mg/dL, Ácido Oxálico 60 mg/dL, Fator Reumatóide 980 UI/mL, Proteína C Reactiva 41,2 mg/dL e Anti-Estreptolisina O 1023 UI/mL.

REACTIVIDAD CRUZADA

Se realizó un estudio de reactividad cruzada, evaluando 45 muestras negativas para anticuerpos IgM contra *Babesia canis*, pero positivas para otras infecciones. Se analizaron 12 muestras positivas para Brucelosis, 2 muestras positivas para Anaplasmosis, 19 muestras positivas para Moquillo, 3 muestras positivas para Parvovirus y 9 muestras positivas para Ehrlichiosis. No se observó reactividad cruzada con ninguna de las muestras. A pesar de los resultados encontrados, no se puede descartar por completo la posibilidad de reactividad cruzada. El diagnóstico final debe considerar los datos clínicos del paciente junto con otros datos de laboratorio.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

El Laboratorio Clínico debe contar con un programa de control de calidad interno, donde se establezcan claramente los procedimientos, estándares, límites y tolerancia a variaciones. Es importante señalar que todos los sistemas de medición tienen una variabilidad analítica característica, que debe ser monitoreada por los propios laboratorios. Para eso, se recomienda utilizar controles, que permitan evaluar la precisión y exactitud de las medidas.

DESEMPEÑO DEL PRODUCTO

Precisión

REPETIBILIDAD

La repetibilidad se calculó a partir de 10 determinaciones sucesivas, utilizando 3 muestras con diferentes valores. Los siguientes resultados fueron obtenidos:

REPETIBILIDAD	MUESTRA		
	1	2	3
Promedio	2,903	0,438	0,147
Desvíó Patrón	0,090	0,022	0,005
Coefficiente de Variación (%)	3,07	5,01	4,03

REPRODUTIBILIDADE

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas durante 3 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com valores diferentes. Foram obtidos os seguintes resultados:

REPRODUTIBILIDAD	MUESTRA		
	1	2	3
Promedio	2,864	0,413	0,147
Desvíó Patrón	0,136	0,026	0,008
Coefficiente de Variación (%)	4,73	6,36	5,72

Sensibilidad y Especificidad Clínica

En el VETLISA BABESIA IgM, las muestras clínicas se analizaron en comparación con otro método de inmunoensayo enzimático. Los resultados muestran que la sensibilidad clínica del kit es del 95,7% y la especificidad clínica es del 96,1%.

Método		Referencia		Total
VETLISA BABESIA IgM	Resultado	Positivo	Negativo	
	Positivo	22	2	24
	Negativo	1	51	52
Resultado Total		23	53	76

Sensibilidad Clínica: 95,7% (22/23) - IC 95%: 87,5% - 100%
Especificidad Clínica: 96,1% (51/53) - IC 95%: 90,9% - 100%
Precisión: 96,0% [(22+51) / (23+53)]

SIGNIFICADO CLÍNICO

La babesiosis es causada por protozoos del género *Babesia*, que afectan a perros y se transmite por la picadura de la garrapata marrón (*Rhipicephalus sanguineus*). El período de incubación de la babesiosis varía entre 7 y 31 días, y la infección puede manifestarse de forma súper aguda, aguda, crónica o asintomática. Los signos clínicos más comunes incluyen anemia, trombocitopenia, hemoglobinuria, fiebre, mucosas pálidas, taquicardia, taquipnea, depresión, anorexia y esplenomegalia, y en perros con la forma crónica de la enfermedad suelen experimentar pérdida de peso y anorexia. Durante la infección, el cuerpo produce anticuerpos que ayudan a combatir el patógeno y son una herramienta de diagnóstico eficaz para indicar una infección. La primera clase de anticuerpos producidos es la inmunoglobulina M (IgM), que aparece entre la 1ª y la 3ª semana después de la infección. La detección de la clase IgM indica la infección reciente y permite identificar la infección en su fase inicial, favoreciendo el tratamiento y control de la enfermedad

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- 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- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

GARANTIA DE QUALIDADE

Antes de ser liberados para el consumo, todos los reactivos producidos por Quibasa Química Básica Ltda. son analizados por el Departamento de Control de Calidad. La calidad de los reactivos está asegurada hasta la fecha de caducidad indicada en el embalaje, siempre que se almacenen y transporten en las condiciones adecuadas.

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 AL CONSUMIDOR

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

Producto con licencia en el Ministerio de Agricultura, Gana-
dería y Abastecimiento desde el 02/03/2022 con el número
10.490/2022.

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

Revisión: Abril/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 ESTÁ DAÑADA
	NO REUTILIZA		PRODUCTO ESTERILIZADO
	PRECAUCIÓN		PELIGRO

VETLISA BABESIA IgM



USAGE INSTRUCTIONS

FUNCTION

Test for qualitative determination of IgM antibodies against *Babesia canis* in serum or plasma of dogs, through immunoenzymatic assay, in microplate. For *in vitro* diagnostics only.

PRINCIPLE OF ACTION

Methodology: Enzyme immunoassay or immunoenzymatic assay.
VETLISA BABESIA IgM is a solid phase immunoenzymatic assay, based on the immunocapture principle for the qualitative detection of IgM antibodies against *Babesia canis* in serum or plasma of dogs. Antibodies against *Babesia canis* present in the sample bind to the recombinant antigens of *Babesia canis* coated on the microplate, forming immobilized antigen-antibody immunocomplexes. After the initial incubation, the microplate is washed to remove unbound materials. The Conjugate, formed by anti-dog IgM antibody linked to peroxidase, is added and binds to IgM antibodies linked to the antigens immobilized on the plate. After a second incubation, the microplate is washed to remove unbound materials. Then, the Substrate is added and incubated, producing a blue, which indicates the presence of IgM antibodies against *Babesia canis*. The Stop Solution is added to stop the reaction, promoting a change of color from blue 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* recombinant antigen.
- 2- Concentrated Conjugate (100X)** - Store at 2 to 8°C. Contains: Dog anti-IgM antibody conjugated to peroxidase and protein stabilizer.
- 3- Concentrated Washing (20X)** - Store at 2 to 8°C. Contains: Buffer solution, surfactant and preservative.
- 4- Diluent** - Store at 2 to 8°C. Contains: Buffer solution, stabilizers, dye, surfactant and preservative.
- 5- Substrate TMB** - Store between 2 and 8°C. Contains: Solution containing 3, 3', 5, 5' - tetramethylbenzidine (TMB), urea peroxide and preservative.
- 6- Stop Solution** - Store at 2 to 8°C. Contains: Sulfuric Acid Solution 1 mol/L.
- 7- Negative Control** - Store between 2 and 8°C. Contains: Serum containing negative serum for IgM antibodies against *Babesia canis* and protein stabilizer. **Potentially infective.**
- 8- Positive Control** - Store between 2 and 8°C. Contains serum containing positive serum for IgM antibodies against *Babesia canis* and protein stabilizer. **Potentially infective.**
- 9- Plate Sealers**

PRESENTATIONS

COMPONENTS	PRESENTATION			
	1	2	3	4
	96 cavities	192 cavities	480 cavities	960 cavities
1- Sensitized Plate	1 unit	2 units	5 units	10 units
2- Concentrated Conjugate	1 x 300 µL	2 x 300 µL	5 x 300 µL	10 x 300 µL
3- Concentrated Washing	1 x 50 mL	2 x 50 mL	5 x 50 mL	10 x 50 mL
4- Diluent	1 x 60 mL	2 x 60 mL	5 x 60 mL	10 x 60 mL
5- Substrate TMB	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL	10 x 15 mL
6- Stop Solution	1 x 15 mL	2 x 15 mL	5 x 15 mL	10 x 15 mL
7- Negative Control	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL	10 x 1 mL
8- Positive Control	1 x 1 mL	2 x 1 mL	5 x 1 mL	10 x 1 mL
9- Plate Sealers	3 units	6 units	15 units	30 units

EQUIPMENT AND OPERATIONAL INPUTS

Materials contained in the kit:
- Reagents described in the previous table
- Instructions for use (manual)

Necessary materials 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 ANS TRANSPORT CONDITIONS

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

SPECIAL CARE

- 1-** For professional in vitro diagnostic veterinary 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 the unused microcavity strips in the sachet, seal and store at 2 to 8 °C.
- 4-** The water used to clean the material must be fresh and free from contaminants.
- 5-** Saturated deionizing columns release alkaline water, several ions and oxidizing and reducing agents that can significantly alter the results.
- 6-** Do not mix reagents from different kits or lots. Do not use expired kit components.
- 7-** Do not eat, drink or smoke at the test site.

- 8-** Do not pipette reagents or sample(s) using the mouth. Do not use the same tip to pipette different samples.
- 9-** The Positive and Negative Controls must be retested for each new test performed.
- 10-** The Stop Solution contains Sulfuric Acid which is a strong acid. Therefore, handle it with due care.
- 11-** The professional must strictly follow the safety rules and routines when handling biological samples. The use of disposable gloves and other personal protective equipment is essential.
- 12-** Pipet the reagents always in the same order to minimize the difference in the reaction time between the wells.
- 13-** As a safety measure, cover the plate during the reaction.
- 14-** Make sure that the bottom of the cavity is clean and dry and that there are no bubbles on the liquid surface before reading the plate. Do not allow the wells to dry out during the test.
- 15-** Handle the kit components with due care, in order to avoid contamination. Use new or properly cleaned tips and containers for handling and do not expose reagents, especially Substrate, to strong light or Hypochlorite vapors during storage or incubation steps.
- 16-** We recommend applying local, state and federal environmental protection standards so that reagents and biological material are disposed of in accordance with current legislation.
- 17-** 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) of Quibasa.
- 18-** Do not use the product in case of damage to the packaging.
- 19-** 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 -20 °C.

PROCESS DESCRIPTON

Stability After Open

The results of the stability test show that the VETLISA BABESIA IgM kit is stable after being opened for at least 30 days. This stability may vary according to the test conditions and the environment. Therefore, it is suggested to monitor the product's performance using internal kit controls and the technique validation criteria.

Preparation of Work Reagents

WASHING SOLUTION
Dilute the contents of the Concentrated Washing (Reagent N° 3) in 1000 mL of distilled or deionized water. After preparation, the solution can be stored at 2 to 30 °C until the expiration date printed on the original bottle. It can be stored at room temperature. If crystallization occurs, heat to 37°C until dissolved.

CONJUGATE SOLUTION

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

VETERINARY USE

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

DILUTION OF SAMPLES

In a test tube, dilute 15 µL of the sample in 300 µL of Diluent, if the test is going to be performed in duplicate. Cap the tube and vortex gently or mix manually by inversion. Dilutions cannot be stored.

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

SUBSTRATE

The Substrate is ready to use.

Technique

- Before starting the test, place all reagents, samples and controls to stabilize at room temperature (15 - 30 °C) for at least 40 minutes.
- 1-** Separate the cavities to be used considering: Controls and Samples (it is recommended to test in duplicate). Return the unused strips of the microplate to the original sealed package.
- 2-** Separate the first cavity for Blank (OPTIONAL).
- 3-** Pipette 100 µL of the Negative Control and Positive Control in the previously determined wells. **Note: The controls are ready for use, there is no need to dilute them.**
- 4-** Pipette 100 µL of the samples previously diluted in the previously determined wells. In the Blank cavity (OPTIONAL), if you have made the option, pipette only 100 µL of the diluent.
- 5-** Gently mix for ± 10 seconds. Cover the wells with plate sealer.
- 6-** Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37°C ± 2°C.
- 7-** Remove the sealer from the cavities.
- 8-** Discard the contents of the cavities by aspiration (Washer) or by decantation (Manual). Use approximately 300 µL of Washing Solution, previously prepared, and perform a total of five (5) wash cycles. Shake for 3 seconds with each wash. To guarantee the drying of the plate, at the end of the washing, beat the plate for a few seconds on absorbent paper.
- Note:** Poor washing / drying can cause inadequate results
- 9-** Pipette 100 µL of Conjugate previously diluted in all wells.
- 10-** Gently homogenize for ± 10 seconds. Cover the cavities with the plate sealer.
- 11-** Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37°C ± 2°C.
- 12-** Remove the plate sealer from the cavities.
- 13-** Repeat item 8.
- 14-** Pipette 100 µL of Substrate into all wells.
- 15-** Gently homogenize for ± 10 seconds. Cover the cavities with the plate sealer.
- 16-** Incubate for 10 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37°C ± 2°C.
- 17-** Remove the plate sealer from the cavities.
- 18-** Pipette 100 µL of Stop Solution into all wells.
- 19-** Gently mix for ± 10 seconds.
- 20-** Read using a double filter: 450 nm / 630 nm in up to 15 minutes (maximum).

TECHNIQUE VERIFICATION

Verify if the results obtained for reading the Blank and the Controls are compatible with the values presented below:

ITEM	ABSORBANCE (DOUBLE FILTER)
Blank	< 0,100
Negative Control	0,100 a 0,300
Positive Control	> 1.000

If the values are outside the expected values, the technique should be repeated.

Calculations

QUALITATIVE

Calculate the Cut Off according to the following formula:

Cut Off = Average Negative Control Absorbance + 0.450

Example:

ITEM	ABSORBANCE
Negative Control	0.212
	0.208
Cut-Off = Average Negative Control Absorbance + 0.450	((0.212 + 0.208) / 2) + 0.450 = 0.660

Calculate the Index by dividing the absorbance of the sample by the Cut Off value. Example:

ITEM	ABSORBANCE
Sample	1.680
Cut Off value	0.660
Index = Sample / Cut Off value	1.680 / 0.660 = 2.55

INTERPRETATION OF RESULT

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

RESULTS	QUALITATE
	INDEX
Negative	< 0.9
Positive	> 1.1
Indeterminate	≥0,9 - ≤1,1

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

Note: The data presented in the examples are for illustration only and cannot be used to calculate the results.

PROCESS LIMITATIONS

The interpretation of a diagnostic test should not be established on the basis of a single test. Other confirmatory tests must be included before a sample is considered positive. A negative result does not exclude the possibility of exposure. The results must be interpreted by a qualified veterinarian together with other clinical information available before the definitive diagnosis of the disease.

INTERFERENTS

No interference was observed for Triglycerides 1500 mg/dL, Ascorbic Acid 2 g/dL, Creatine 200 mg/dL, Bilirubin 1 g/dL, Albumin 2 g/dL, Hemoglobin 1000 mg/dL, Oxalic Acid 60 mg/dL, Factor Rheumatoid 980 IU/mL, C Reactive Protein 41.2 mg/dL and Anti-Streptolysin O 1023 IU/MI.

CROSS REACTIVITY

A cross-reactivity study was carried out, evaluating 45 negative samples for IgM antibodies against *Babesia canis*, but positive for other infections. Among then, it was tested 12 positive samples for Brucellosis, 2 positive samples for Anaplasmosis, 19 positive samples for Distemper, 3 positive samples for Parvovirus and 9 positive samples for Ehrlichiosis. No cross reactivity was observed with any of the samples. Despite the results found, the possibility of cross-reactivity cannot be completely ruled out. The final diagnosis should consider the patient's clinical data along with other laboratory data.

INTERNAL QUALITY CONTROL

The Clinical Laboratory must have an internal quality control program, where procedures, standards, limits and tolerance for variations are clearly established. It is important to note that all measurement systems have a characteristic analytical variability, which must be monitored by the laboratories themselves. For that, it is recommended to use controls, which allow to evaluate the precision and accuracy of the measurements.

PRODUCT PERFORMANCE

Accuracy

REPEATIBILITY

Repeatability was calculated from 10 successive determinations, using 3 samples with different values. The following results were obtained:

REPEATIBILITY	SAMPLE		
	1	2	3
Average	2.903	0.438	0.147
Standard Deviation	0.090	0.022	0.005
Coefficient of Variation (%)	3.07	5.01	4.03

REPRODUCIBILITY

Reproducibility was calculated from 10 successive determinations over 3 consecutive days, using 3 samples with different values. The following results were obtained:

REPRODUCIBILITY	SAMPLE		
	1	2	3
Average	2.864	0.413	0.147
Standard Deviation	0.136	0.026	0.008
Coefficient of Variation (%)	4.73	6.36	5.72

Clinical Sensitivity and Specificity

In the VETLISA BABESIA IgM, clinical samples were analyzed in comparison with another method of Enzyme immunoassay. The results show that the clinical sensitivity of the kit is 95.7% and the clinical specificity is 96.1%.

Method	Reference		Total
	Positive	Negative	
VETLISA BABESIA IgM	Positive	22	24
	Negative	1	51
	Total Result	23	53
		53	76

Clinical Sensibility: 95.7% (22/23) - IC 95%: 87.5% - 100%
Clinical Specificity: 96.1% (51/53) - IC 95%: 90.9% - 100%
Accuracy: 96.0% [(22+51) / (23+53)]

CLINICAL MEANING

Babesiosis is caused by protozoa of the genus *Babesia*, which affect dogs and is transmitted by the bite of the brown tick (*Rhipicephalus sanguineus*). The incubation period for babesiosis varies between 7 and 31 days, and the infection may manifest itself in a super-acute, acute, chronic or asymptomatic manner. The most common clinical signs include anemia, thrombocytopenia, hemoglobinuria, fever, pale mucous membranes, tachycardia, tachypnea, depression, anorexia and splenomegaly, and in dogs with the chronic form of the disease, they usually experience weight loss and anorexia. During infection, the body produces

antibodies that help fight the pathogen and are an effective diagnostic tool to indicate infection. The first class of antibodies produced is immunoglobulin M (IgM), which appears between the 1st and the 3rd week after infection. The detection of the IgM class indicates the recent infection, and allows the infection to be identified in its initial phase, favoring the treatment and control of the disease.

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 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 heterologous challenge. Veterinary Parasitology, v.68, p. 51-55, 1997.
- 6- QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

QUALITY ASSURANCE

Before being released for consumption, all reagents produced by Quibasa Química Básica Ltda are tested by the Quality Control Department. The quality of the reagents is ensured until the expiration date mentioned on the packaged, when stored and transported under the appropriate conditions.



QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 – Santa Branca
CEP 31.565 -130 - Belo Horizonte - MG - Brazil
Phone: (31) 3439.5454
E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 – Made in Brazil

CUSTOMER SERVICE

Customer Advisory Service
Phone: 0800 0315454
E-mail: sac@bioclin.com.br

Product Licensed at the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply from 03/03/2022 under the number 10.490/2022.

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

Review: April/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