Versión 01/2021

MegaFLUO® BABESIA canis ad us. vet.

Diagnóstico *in vitro*

Testkit para la detección indirecta semicuantitativa mediante inmunofluorescencía de anticuerpos IgG específicos contra *Babesia canis* en plasma o suero del perro

INSTRUCCIONES DE USO

DIAGNOSTIK MEGACOR

6912 Hörbranz – AUSTRIA

1. INFORMACIÓN DEL KIT DE ANÁLISIS

CONTENIDO

1 Kit de análisis **MegaFLUO® BABESIA** canis contiene:
- 10 portaobjetos recubiertos con antígenos de *Babesia canis*
- 1 frasco cuentagotas con 3,0 ml FLUO FITC conjugado IgG anti-canino
- 1 frasco cuentagotas con 0,5 ml control positivo
- 1 frasco cuentagotas con 0,5 ml control negativo
- 1 frasco cuentagotas con 3,0 ml medio de montaje
- 1 instrucciones de uso

MATERIAL DE LA MUESTRA

Suero o plasma

ALMACENAMIENTO Y DURABILIDAD

- La temperatura de almacenamiento para el test-kit es de **+2–8°C**
- Los kits de prueba pueden ser utilizados durante 12 meses después de la fecha de fabricación.
- Las distintas temperaturas de almacenamiento indicadas en las etiquetas de los componentes, indican su almacenamiento para compras de los componentes individuales (→ otra fecha de vencimiento).

NECESARIA, PERO NO LOS MATERIALES DEL KIT DE ENSAYO SIEMPRE

PBS (solución salina tamponada con fosfato) pH 7,2 a 7,4, recipiente para el lavado de PBS, tubos para diluciones de suero, micropipetas, 24×50 mm cubreobjetos, microscopio de fluorescencia con el sistema de filtro para FITC (fluoresceína, la longitud de onda de excitación de 465 a 495, 515 a 555 de filtro de barrera) y 400× magnificación, una incubadora con 37°C, cámara de humedad.

RESPONSABILIDAD

Todo el riesgo relacionado con el uso de este producto es asumido por el comprador. El fabricante no se hace responsable de los daños indirectos, especiales o consecuentes que puedan resultar del uso, la ejecución y evaluación del análisis con este producto.

Mantener fuera del alcance de los niños

SÍMBOLO EXPLICACIÓN

- Almacenamiento – ver etiqueta
- Para el uso veterinario
- Diagnóstico *in vitro*
- Seguir las instrucciones de uso detenidamente
- Usar antes de – ver etiqueta
- LOT Número de lote
- ! No utilizar reactivos de otros kits de análisis, numero de lote o pasada la fecha de caducidad.

2. PRINCIPIO DEL ANÁLISIS

Suero de perro es diluido con PBS (pH 7,2 a 7,4) y se aplica sobre los campos de antígeno del portaobjeto para permitir en el caso de una muestra positiva, una reacción de acople antígeno-anticuerpo a 37°C de temp. Enjuague posterior de anticuerpo no acoplado, con PBS, es decir que los acóples no específicos en el suero, son lavados. En el siguiente paso, se aplica el FLUO conjugado FITC IgG anti-canino, que se acopla a los complejos antígeno-anticuerpo. Después de un período de incubación de 30 minutos, el conjugado no unido se elimina por lavado con PBS. Por último, los campos de antígeno se cubren con el medio de montaje y el portaobjeto queda así protegido. La evaluación se realiza mediante el uso de un un microscopio de fluorescencia (sistema de filtro para FITC) a 400× de magnificación.

3. PRECAUCIONES

- Asegúrese del úso exacto de los componentes del kit, solo así está garantizada de forma segura el resultado para cada muestra.
- Para cada dilución de la muestra debe utilizar una nueva punta de pipeta.
- El conjugado es fotosensible y sensible al calor, por lo que se debe almacenar hasta antes de la prueba en la oscuridad y a 2–8°C de temperatura.
- El conjugado contiene azul de Evans como colorante, que es potencialmente cancerígeno. El contacto con la piel o la ingestión deben ser evitados.
- El material de la muestra y los portaobjetos deben considerarse potencialmente infecciosos y deben ser desechados de acuerdo con las estipulaciones vigentes en cada país una vez concluida la prueba.

4. INFORMACIÓN ADICIONAL IMPORTANTE PARA LA EVALUACIÓN DE LA PRUEBA

Seroprevalencia

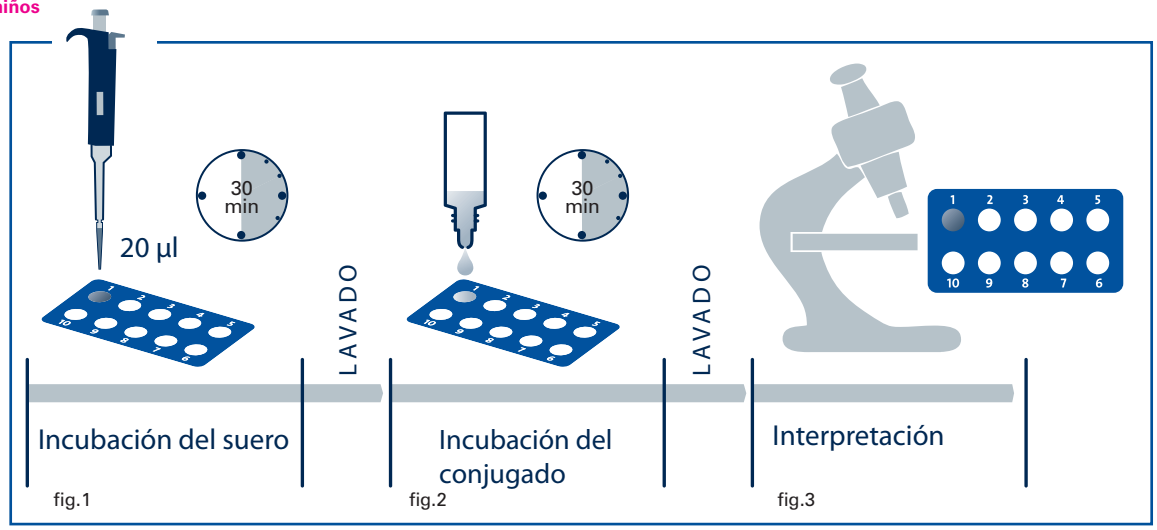
El límite puede variar según la región y el origen de la muestra (según la prevalencia y el estado endémico). Por lo tanto, se recomienda que cada laboratorio establezca el cut-off individual.

Una infección aguda (incremento de 2 a 4 veces en título: "seroconversión") sólo se puede determinar por el título de un par de suero (2 muestras a intervalos de 2–3 semanas).

Además, los resultados de la prueba siempre deben interpretarse junto con la anamnesis, la clínica y los parámetros de laboratorio adicionales.

Diferentes formas Babesia

Para la producción de los portaobjetos, se usa sangre selecionada de perros infectados naturalmente. Por lo tanto, como cuerpos de inclusión pueden verse merozoitos y trofozoítos, y estos pueden aparecer en un número variable.



5. PROCEDIMIENTO

1. Los componentes del kit de ensayo (excepto el conjugado!) y los sueros de prueba se deben encontraban en el momento de la aplicación a temperatura ambiente.
2. Hacer diluciones apropiadas (por ejemplo, 1:160 y 1:320) con PBS para atrás con todos los sueros de prueba. Para sueros detectados como positivos en una prueba anterior, es aconsejable preparar diluciones en serie 2 veces con PBS con el fin de determinar el título final (= más alto, sin embargo, la dilución positiva).
3. Retire el portaobjeto cuidadosamente del sobre de aluminio y colocarlo en la cámara de humedad. Colocar a cada gota 1 de (20 µl) de controles positivos y negativos en los campos de antígeno por separado. Pipeta de cada dilución de suero también 20 µl para separar campos de antígeno (fig.1). Asegúrese de que los campos de antígeno se humedecen por completo.
4. Incubar durante 30 minutos a una temperatura de 37°C.
5. Etapa de lavado: Toque en las soluciones de suero suavemente y remover los portaobjetos durante 5 minutos en PBS. Repita este paso para otros 5 minutos en PBS fresco. A continuación, enjuagar brevemente el portaobjetos con agua destilada. Golpear suavemente el exceso de agua y secar la humedad con cuidado con papel absorbente o un hisopo de algodón el revestimiento de teflón entre los campos con el antígeno. Cuide que los campos de antígeno no se sequen!

   Si utiliza un frasco para lavar, no dirigir el chorro directamente sobre los campos de antígeno.
6. Abrir la cámara húmeda y gotear inmediatamente en cada campo de antígeno utilizado, 1 gota FLUO FITC conjugado IgG anti-canino como en la (fig. 2). Asegúrese de que los campos de antígeno se humedescan por completo.
7. Incubar durante 30 minutos a una temperatura de 37°C y en oscuridad, con el fin de proteger al conjugado que es fotosensible.
8. Repetir nuevamente la etapa de lavado, como se describe en el paso 5.
9. Aplique unas gotas de medio de montaje sobre el cubreobjetos y colocarlo cuidadosamente sobre los campos de antígeno del portaobjeto utilizado. Tratar de exprimir las burbujas de aire, suavemente.
10. Evaluar los portaobjetos bajo un microscopio de fluorescencia a 400× magnificación (fig. 3) mediante la comparación de los patrones de fluorescencia de las muestras con los del control positivo o negativo.
11. Portaobjetos asi sellados pueden ser almacenados 7 días a 2–8°C, en la oscuridad.

6. EVALUACIÓN

Para la evaluación se requiere un microscopio de fluorescencia con un sistema de filtro para FITC (excitación de longitud de onda 465–495, 515–555 filtro de corte) y es una magnificación de 400×.

Las imágenes de fluorescencia (forma, densidad, etc.) de los controles negativo y positivo generalmente se usan como imágenes de referencia. ¡Los patrones de reacción desviados son inespecíficos, es decir negativos!

Imagen de fluorescencia positiva ≥ 1:160
Hay cuerpos de inclusión brillantes, claramente reconocibles, regularmente teñidos e intensamente demarcados (merozoitos/trofozoítos) en el citoplasma (o, en el caso de eritrocitos rupturados, exteriormente) de los eritrocitos infectados.

Si recomienda que las muestras positivas se diluyan adicionalmente para determinar el título final (= más alto, la dilución es positiva).

Imagen de fluorescencia de cut-off / cut-off recomendado: 1:160
Los cuerpos de inclusión muestran una ligera (1+) fluorescencia amarillo-verde.

Imagen de fluorescencia negativa < 1:160
Los cuerpos de inclusión no muestran fluorescencia amarillo verdosa alguna y son de color rojo grisáceo o no visibile!

Reaccion fluorescente inespecífica
Imagenes de las muestras que difieren a las del control positivo deben ser evaluadas como reacciones inespecíficas y, por lo tanto, deben ser consideradas como negativas.

Las ilustraciones se pueden encontrar en http://www.megacor.at