



PCRrun™

Kit para Detecção Molecular de Anaplasma em Cães

Somente para uso em diagnóstico veterinário *in vitro*

FINALIDADE

O Kit para Detecção Molecular de Anaplasma em Cães tem a função de detectar a presença de DNA do agente *Anaplasma platys* em sangue total de cães. O kit pode ser usado para detecção em infecções agudas. Contém todos os componentes requeridos para uma execução rápida e fácil do procedimento.

PRINCÍPIO

O PCRrun® é um ensaio molecular baseado na amplificação de uma parte do gene Citrato Sintase (gltA). Tem a finalidade de detecção qualitativa de *Anaplasma platys*. Esse kit é desenvolvido para uso no PCRrun® Reader.

ESTOCAGEM E ARMAZENAMENTO

- Conservar entre 2-25 °C (temperatura ambiente ou refrigerado).
- Evitar exposição direta de luz solar.
- Não utilizar após a validade informada no rótulo.
- Não congelar ou deixar em local que ocorra extremos de temperatura.

Precauções:

- O ensaio PCRrun® não foi desenvolvido para amostras frescas. Uma apropriada extração de DNA deve ser anteriormente executada para uso no presente kit.
- Para evitar contaminação de DNA na reação, sempre utilizar luvas descartáveis durante a realização do teste.
- Abrir e remover os tubos de reação PCRrun das embalagens seladas de alumínio, somente imediatamente antes da sua utilização.
- **Retornar os tubos de reação PCRrun não utilizados para o pacote de alumínio original, juntamente com o secador. Selar com fita adesiva.**
- Não utilize o kit se a bolsa ou os componentes estejam danificados.
- Cada componente neste kit é adequado para uso apenas com um número de lote específico. Os componentes foram homologados no controle da qualidade como unidade de lote padrão. Não misturar componentes de diferentes números de lote.
- Utilizar procedimentos sanitários do Brasil, destinados a resíduos biológicos e moleculares, no manuseio e descarte de componentes do kit.

INFORMAÇÕES

O *Anaplasma platys* também conhecido como *Ehrlichia platys* é um agente intracelular obrigatório, Gram-negativa pertencente à ordem *Rickettsiales*, família *Anaplasmataceae*¹. O agente é responsável por causar trombocitopenia cíclica canina, uma doença transmitida por meio da picada de carrapatos infectados. Cães são os hospedeiros mais comuns entre os mamíferos embora raros casos de infecções em gatos têm sido relatados². Naturalmente a ocorrência de infecções pode resultar em doença clínica leve a severa. O *Anaplasma platys* instala-se em plaquetas causando problemas na coagulação sanguínea resultando em hemorragias e outros danos ao organismo do animal.

Durante a fase inicial, a contagem de plaquetas é reduzida e alguns cães demonstram evidência clínica de sangramento. Os sinais clínicos presentes são febre, depressão, sangramento na cavidade oral e narinas, mucosas pálidas, petéquias e linfadenopatia. Os cães podem também obter infecções subclínicas e cronicamente carrear o *Anaplasma* por meses sem apresentar

sinais da doença até que o sistema imune do cão seja afetado por fatores como estresse.

DIAGNÓSTICO

Anormalidades hematológicas em cães com anaplasmoses incluem trombocitopenia e anemia. Durante a bacteremia e subsequente trombocitopenia, a contagem de plaquetas pode ser inferior a 20.000/μL. O diagnóstico pode ser feito por detecção microscópica de *A. platys*. Quando presente, esses corpúsculos de inclusão podem ser vistos em plaquetas identificadas em esfregaços sanguíneos e creme leucocitário corados pelo método de Giemsa. Devido à parasitemia cíclica, que pode ocorrer em intervalos de uma a duas semanas, o patógeno é ausente ou presente em número muito reduzido. Por essa razão, a avaliação microscópica nem sempre é confiável podendo levar a resultados falso-negativos. Além disso, resultados falso-positivos podem ocorrer quando há artefatos similares a corpúsculos de inclusão de mórulas de *A. platys*. Achados bioquímicos incluem hipalbuminemia, hiperglobulinemia, fosfatase alcalina elevada ou hiperbilirrubinemia. Co-infecção por outros patógenos pode ocorrer e como consequência aumentar a severidade da doença alterando a apresentação clínica do paciente e dificultando o diagnóstico bem como o tratamento e o prognóstico.

Um protocolo de imunofluorescência indireta (IFI) tem sido desenvolvido para a detecção de anticorpos contra *A. platys*. A soroprevalência é alta em áreas endêmicas, porém um diagnóstico não pode ser baseado apenas no título de anticorpos (que pode indicar infecções anteriores). Durante o início de infecções agudas, os anticorpos podem não estar presentes.

Métodos moleculares como o PCRrun®, podem ser empregado para detecção de *A. platys* quando a parasitemia ainda é baixa. Ensaios de PCR são mais sensíveis e acurados métodos para detecção de anaplasmoses causada por *A. platys* durante estágios agudo e crônico de parasitemia³.

CONTEÚDO DO KIT

Componentes	Conteúdo	Quantidade
Envelope de alumínio	8 tubos contendo enzimas e outros componentes liofilizados	2
Tampão PCRrun®	Tampão PCRrun® para dissolver os pellets liofilizados	2 frascos, 200 μL
PCRrun® Controle positivo	DNA de <i>Anaplasma</i> liofilizado	1 frasco

EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS:

- Pipetas com barreira para aerossol;
- **Água ultra pura;**
- Kit de extração de DNA compatível com kit PCRrun®;
- PCRrun® Reader fornecido pela Biogal;
- Cronômetro;
- Tesoura;
- Marcador permanente de ponta fina;
- Luvas de proteção;
- Para amostras de urina: microcentrífuga com alcance de 10.000 rpm.

COLHEITA DE AMOSTRA E ARMAZENAMENTO

O kit é usado para detectar ácidos nucleicos extraídos de sangue total por kits de extração de DNA desenvolvidos para uso em reações de PCR. As amostras de sangue podem ser coletadas em EDTA, heparina ou citrato de sódio. Anticoagulantes possuem uma substancial consequência em reações de PCR e por essa razão, é necessário que o volume de sangue seja corretamente coletado de acordo com as instruções contidas no tubo.

Para melhores resultados, amostras recém-adquiridas e DNA recém-extraído são recomendados para as reações com o kit PCRun®.

Amostras e DNA extraído podem ser mantidos a 2-8°C por até 24 horas ou -20°C por um período de tempo maior.

PROTOCOLO - REAÇÃO PCRun®

1. Limpar a área de trabalho para o ensaio. A área de trabalho deve ser descontaminada com solução de hipoclorito a 3,5%, diluído com água numa proporção de 1:10.
2. Material para o ensaio:
 - ✓ DNA extraído
 - ✓ Embalagem com tubos de reação
 - ✓ Tampão PCRun®
 - ✓ Pipeta de 5 µL
 - ✓ Pipeta de 15 µL
 - ✓ Controle Positivo PCRun®
 - ✓ Marcador permanente de ponta fina
 - ✓ PCRun® Reader (Utilizar o manual de instruções PCRun® Reader para executar o procedimento)

3. Controle Positivo

Um controle positivo é fornecido com o kit. É recomendado que esse controle seja preparado ao mesmo tempo da preparação das amostras a serem testadas..

A concentração final da solução será de 10⁵ cópias/5µL.

- a. Adicione 500 µL de água de grau molecular (água ultra pura, própria para reações de biologia molecular) ao frasco contendo o *pellet* liofilizado. Agite em vórtex e deixe repousar por 5 minutos em temperatura ambiente. Agite em vórtex novamente. O frasco contém 10⁶ cópias do gene alvo/5µL. Rotule o frasco. Esta é a solução de estoque.
- b. Prepare um tubo contendo 45µL de água de grau molecular (água ultra pura).
- c. Adicione 5µL da solução de estoque (preparada no item "a") nesse tubo resultando em uma concentração final de 10⁵ cópias/5µL e agite em vórtex. Essa diluição será empregada como controle positivo.
- d. Use 5µL do controle positivo para as reações PCRun da mesma forma como é realizado com DNA de amostras a serem testadas. O restante da solução de estoque deve ser distribuído em pequenos volumes e mantido a -20°C para serem usados posteriormente.

O controle positivo pode ser uma fonte de contaminação. Por isso pede-se o máximo de atenção e cuidado para que o mesmo não tenha contato com outros componentes do kit. O controle positivo deve ser adicionado ao tubo de reação e seguir com as demais complementações realizadas para amostras a serem testadas.

4. Ligue o PCRun® Reader e siga as instruções do manual do equipamento.

5. Remova os tubos PCRun® da embalagem de alumínio. Tenha cuidado para retornar os tubos que não foram usados para o envelope selando-o para manter um ambiente seco. Oito tubos de reação estão conectados por uma pequena tira de plástico. Com uma pequena tesoura, desconecte o número de tubos desejados sem prejudicar as tampas. Bata o tubo verticalmente e suavemente sobre uma superfície plana e firme para que todo o conteúdo desça ao fundo do tubo. A pequena pastilha branca deve estar localizada

na parte inferior do tubo.

6. Identificar os tubos com o número de cada amostra.

7. Cuidadosamente, adicione 15 µL do tampão PCRun® no tubo de reação (fazer um por vez). Fechar a tampa e incubar a mistura à temperatura ambiente por 1 minuto para permitir que o pellet se dissolva completamente.

8. Adicionar 5 µL da amostra de DNA dentro do tubo PCRun® e misture rigorosamente. Fechar a tampa do tubo firmemente e bater suavemente o tubo em uma superfície para trazer todo o fluido para o fundo do tubo.

9. Coloque o tubo de reação no PCRun® Reader pré aquecido e siga as instruções do manual do equipamento.

ANÁLISE DA REAÇÃO PCRun®

Após aproximadamente 1 hora de incubação, resultados de cada reação irão aparecer na tela do equipamento. Siga as instruções encontradas no manual que acompanha o PCRun® Reader.

LIMITAÇÕES

Como qualquer teste de diagnóstico, resultados obtidos com o Kit de Detecção Molecular PCRun® devem ser interpretados juntamente com achados clínicos e outros procedimentos laboratoriais.

Amostras de animais submetidos a tratamento com antibióticos podem obter resultado negativo na reação de PCR.

SENSIBILIDADE

A reação PCRun® pode detectar um mínimo de 10² cópias do gene alvo em DNA purificado.

REFERÊNCIAS

1. Dumler, J.S.; Barbet, A.F.; Bekker, C.P.; Dasch, G.A.; Palmer, G.H.; Ray, S.C.; Rikihisa, Y.; Rurangirwa, F.R. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophilum. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51 (6), 2145-2165.
2. Lima, M.L.F.I.; Soares, P.T.; Ramos, C.A.N.; Araújo, F.R.; Ramos, R.A.N.; Souza, I.I.F.; Faustino, M.A.G.; Alves, L.C.A (2010). Molecular detection of Anaplasma platys in a naturally-infected cat in Brazil. Braz. J. Microbiol. 41 (2), 381-385.
3. Ferreira, R.F.; Cerqueira, A.M.F.; Pereira, A.M.; Guimarães, C.M.; Garcia de Sá, A.; Abreu, F.S.; Massard, C.L.; Almosny, N.R.P.; (2007). Anaplasma platys Diagnosis in Dogs: Comparison Between Morphological and Molecular Tests. Intern J Appl Res Vet Med. 5 (3), 113-119.



Fabricante: Biogal Galed Labs. Acs. Ltd.
TEL: +972 (0)4 9898605 FAX: +972 (0)4 9898690
email: info@biogal.co.il www.biogal.co.il
Kibbutz Galed, 1924000 - Israel