



Kit para Detecção Molecular de Micoplasma em Gatos

Somente para uso em diagnóstico veterinário *in vitro*

FINALIDADE

O Kit para Detecção Molecular de Micoplasma em gatos PCRRun® é desenvolvido para a detecção de DNA de *Mycoplasma haemofelis* isolado de **sangue total** ou **medula óssea**. O Kit pode ser usado para detecção de infecções agudas. Contém todos os componentes requeridos para ser de fácil e rápida execução.

PRINCÍPIO

O PCRRun® é um teste molecular baseado na amplificação de parte do gene rDNA 16s. É usado para detecção qualitativa de *Mycoplasma haemofelis*. Esse kit foi desenvolvido para ser usado juntamente com o PCRRun® Reader.

ESTOCAGEM E ARMAZENAMENTO

- Conservar entre 2-25 °C (temperatura ambiente ou refrigerado).
- Evitar exposição à 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 a contaminação de DNA na reação, deve-se sempre utilizar luvas descartáveis durante a realização do teste.
- Abrir e remover os tubos de reação PCRRun® das embalagens seladas de alumínio somente no momento de sua utilização.
- Retornar os tubos de reação PCRRun® não utilizados para o pacote de alumínio original, juntamente com objeto secante. Selar com fita adesiva.**
- Não utilize o kit se os componentes estiverem danificados.
- Cada componente neste kit é adequado para uso apenas com um número do lote específico. Os componentes foram homologados no controle da qualidade como unidade de lote padrão. Não misturar componentes de diferentes lotes.
- Utilizar procedimentos sanitários do Brasil destinados a resíduos biológicos e moleculares, no manuseio e descarte de componentes do kit.

INFORMAÇÕES

Os micoplasmas são agentes Gram-negativos carentes de parede celular rígida e que possuem afinidade por membranas de eritrócitos. Três espécies têm sido identificadas em gatos: *M. haemofelis*, *M. haemominutum* e *M. turicensis*. *Mycoplasma haemofelis* (formalmente classificado como *Haemobartonella felis*) é

considerado como agente causador de anemia hemolítica felina. Os organismos aparecem em esfregaço sanguíneo e são pleomórficos. Geralmente formam cadeias de três a seis organismos. A anemia hemolítica causada por *M. haemofelis* é usualmente regenerativa a menos que essa resposta seja suprimida por outra doença como, por exemplo, infecção por vírus da leucemia felina. A parasitemia está diretamente relacionada com a diminuição dos valores de hematócrito e aumento da carga parasitária. Devido à parasitemia cíclica, a presença dos organismos varia de numerosa a rara.

A transmissão pode ocorrer por vetores como piolhos, pulgas, carrapatos e mosquitos bem como transfusões de sangue ou uso de seringas e materiais cirúrgicos contaminados. Transmissão vertical e por agressões entre gatos têm sido relatadas. Muitos gatos infectados com *M. haemofelis* tornam-se portadores assintomáticos e podem desenvolver doença branda quando estressados².

DIAGNÓSTICO

Em um animal com doença aguda, a anemia macrocítica e normocrômica regenerativa é mais comumente encontrada. Os sinais clínicos incluem mucosas pálidas, esplenomegalia, letargia, anorexia, depressão, perda de peso e fraqueza. Valores de hematócrito em gatos apresentando sinais clínicos da doença são 50% em níveis normais. Febre ocorre em alguns gatos agudamente infectados e pode ser intermitente em alguns animais crônicos. A fase assintomática na qual o gato torna-se carreador pode durar anos com o paciente clinicamente normal e com o agente raramente detectável no sangue. O diagnóstico precoce e o tratamento apropriado são a chave para um bom prognóstico. A confirmação laboratorial é tradicionalmente realizada por avaliação citológica dos eritrócitos, porém, um olho experiente é necessário para diferenciar micoplasmas de artefatos. Por essa razão, resultados falso-negativos são comuns. O agente se desprende dos eritrócitos em amostras não frescas (aproximadamente 24 horas) e pode ser interpretado como uma sujidade levando ao erro de diagnóstico.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido desenvolvida obtendo maior especificidade e sensibilidade quando comparada à microscopia. Reações de PCR podem detectar patógenos em amostras em que o organismo não está presente na célula e são ferramentas úteis na identificação de gatos com baixa carga do agente.

CONTEÚDO DO KIT

Componentes	Conteúdo	Quantidade
Embalagem de alumínio	8 tubos com enzimas e outros componentes liofilizados	2
Tampão PCRRun	Tampão PCRRun® para dissolver o liofilizado do tubo	2 tubos, 200 µL
PCRRun® Controle Positivo	PCRRun® DNA de <i>Mycoplasma</i> liofilizado	1 tubo

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;

COLHEITA DE AMOSTRA E ARMAZENAMENTO

Esse kit é usado para detectar ácidos nucleicos extraídos de sangue total ou medula óssea 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 colhido 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 PCRRun®.

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 PCRRun®

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 PCRRun®;
- ✓ Pipeta de 5 µL;
- ✓ Pipeta de 15 µL;
- ✓ Controle Positivo PCRRun®;
- ✓ Marcador permanente de ponta fina;
- ✓ PCRRun® Reader (Utilizar o manual de instruções PCRRun® 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 PCRRun da mesma forma como é realizado com DNA de amostras a serem testadas. O restante da solução de estoque dele 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 PCRRun® Reader e siga as instruções do manual do equipamento.

5. Remova os tubos PCRRun® 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 PCRRun® 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 PCRRun® 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 PCRRun® Reader pré aquecido e siga as instruções do manual do equipamento.

ANÁLISE DA REAÇÃO PCRRun®

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

LIMITAÇÕES

Como qualquer teste de diagnóstico, resultados obtidos com o Kit de Detecção Molecular PCRRun® 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 PCRRun® pode detectar um mínimo de 10² cópias do gene alvo em DNA purificado.

REFERÊNCIAS

1. Messick, JB. 2004. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): A review and new insights into pathogenic potential. Vet. Clin. Pathol., 33, 2-13.
2. Tasker, S. 2010. Haemotropic mycoplasmas: What's their real significance in cats?. Journal of Feline Medicine and Surgery. 12 (5), 369-381.
3. Jensen, WA, Lappin, MR, Reagan, W, et al. 2001. Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of Haemobartonella felis in naturally infected cats. Am J Vet Res., 62, 604-608.



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