



PCRRun™

Kit para Detecção Molecular de RNA de Cinomose em cães 8 amostras

Somente para uso Veterinário e *In vitro*

SKU30CDR108 **Instruções de uso**

FINALIDADE

O kit contém todos os componentes requeridos para executar o teste de forma rápida e simples.

PRINCÍPIO

O Kit de Detecção Molecular PCRRun® destina-se à detecção do vírus da cinomose canina em RNA **isolado de sangue, urina, creme leucocitário, swabs de garganta e nasal, células e tecidos**, usando um kit de extração de RNA N°30 PRE308. O kit deve ser empregado durante uma infecção ativa e contém todos os componentes descartáveis necessários para realizar um teste fácil e preciso.

ESTOCAGEM E MANUSEIO

- 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.
- Não submeter a altas temperaturas

Precauções:

- Para evitar contaminação de RNA 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 a embalagem de alumínio original, juntamente com o dessecante. Selar com fita adesiva.**
- Não utilize o kit se a embalagem ou os componentes estiverem 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.
- Realizar a extração de RNA em uma área separada da área utilizada para a reação PCRRun.

INFORMAÇÕES

A cinomose canina é uma doença altamente contagiosa causada por um morbilivírus RNA. Filhotes jovens e não vacinados e cães mais velhos não imunizados tendem a ser mais suscetíveis à doença. A principal via de infecção é por gotículas de aerossol das cavidades oral/nasal de animais infectados. O vírus da cinomose se replica inicialmente no tecido epitelial e linfóide do trato respiratório superior. Dependendo do nível de imunidade durante o estágio virêmico, o vírus pode se espalhar pela corrente sanguínea, replicando-se nas células mononucleares, no epitélio do sistema respiratório e gastrointestinal, bem como no sistema nervoso central (SNC). Nos casos em que ocorre invasão do SNC, os neurônios também serão infectados. A cinomose costuma ser fatal e os cães que sobrevivem geralmente apresentam danos permanentes e irreparáveis ao sistema nervoso¹.

DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico da cinomose canina precoce é difícil devido ao amplo espectro de sinais que podem ser confundidos com outras doenças respiratórias e entéricas. O diagnóstico deve ser baseado na história (vacinação e exposição), múltiplos sinais clínicos sistêmicos (respiratórios, gastrointestinais, neurológicos e dermatológicos) e confirmação laboratorial.

Inicialmente, os cães infectados desenvolverão febre transitória leve acompanhada de leucopenia, seguida de secreção óculo-nasal, febre,

tosse, letargia, redução do apetite, diarreia e vômitos. Nos casos de invasão do SNC, aparecerão sinais neurológicos, como espasmos musculares (mioclonia), convulsões com movimentos de mastigação da mandíbula e paralisia parcial ou completa. O vírus também pode causar espessamento dos coxins, levando ao seu apelido de "doença da almofada dura". Em casos mais leves, os sinais podem ser semelhantes a outros agentes do complexo de doenças respiratórias infecciosas caninas. Pode ocorrer infecção subclínica com excreção, dependendo do nível de imunidade do hospedeiro.

Os achados clínicos iniciais podem incluir linfopenia e inclusões microscópicas em leucócitos e eritrócitos corados. Os achados laboratoriais e a análise do líquido cefalorraquidiano geralmente são inespecíficos. Vários métodos de detecção aumentam a suspeita diagnóstica de CDV. Os testes sorológicos incluem títulos internos de IgM para detecção de infecção ou exposição recente ao CDV (Biogal, Immunocomb), IFA e ELISA. Os testes de antígeno incluem isolamento de vírus, imuno-histoquímica, imunocromatografia e reação em cadeia da polimerase². Embora o isolamento do vírus seja o padrão-ouro, ele requer laboratórios especializados. Considerando o potencial infeccioso e as altas taxas de mortalidade da doença, a necessidade de realizar um diagnóstico rápido antemortem da cinomose é essencial. A sensibilidade, especificidade e rapidez de métodos moleculares como

o PCRRun quando comparados com os métodos convencionais, tornam as técnicas moleculares preferíveis para o diagnóstico de CDV³.

CONTEÚDO DO KIT

Conteúdo	Quantidade
8 tubos de reação simples com liofilizados da cinomose	1
Tampão PCRRun® para dissolver novamente a reação liofilizada <i>pellets</i> .	1 frasco (200 µL)
Embalagem de alumínio com dispositivo de detecção de ácido nucleico descartável.	8

EQUIPAMENTOS E SOLUÇÕES NECESSÁRIOS:

- Biogal PCRRun® Extrator de RNA da Amostra
- Bloco de aquecimento a 60 °C compatível com tubos de 0,2 mL para PCR. Comercializado pela Biogal.
- Temporizador
- Tesoura
- Caneta marcadora permanente de ponta fina
- Luvas descartáveis
- Pipetas calibradas e ponteiras com barreira para aerossol podem ser usada no lugar das pipetas de plástico.

COLETA, ESTOCAGEM E TRANSPORTE

O kit é adequado para detectar ácido ribonucleico associado ao vírus da cinomose extraído de vários tipos de amostra ao empregar kits de extração de RNA adequados para uso com PCR de transcrição reversa (RT). Amostras relevantes para a detecção molecular do RNA do CDV incluem sangue total, LCR e urina, bem como saliva, swabs nasais, retais e conjuntivais. As amostras sugeridas de acordo com os estágios da doença são:

- Sangue total durante os períodos febris;
- Esfregaços nasais e conjuntivais para detecção de infecção aguda em cães com conjuntivite e/ou sinais respiratórios;
- Esfregaços retais ou fezes para cães com sinais gastrointestinais;
- Urina para cães com sinais neurológicos.

Deve-se observar que a urina contém inibidores da reação em cadeia da polimerase (PCR), portanto, uma preparação apropriada da amostra deve ser usada.

O uso de dois fluidos corporais diferentes (por exemplo, urina e LCR) pode aumentar a sensibilidade do RT-PCR para o diagnóstico antemortem de cinomose². Ao usar o PCR para fins diagnósticos, é imperativo estar ciente do histórico de vacinação do paciente. **Certos protocolos de PCR detectam o vírus da vacina por algumas semanas após a vacinação³.**

O RNA extraído pode potencialmente se degradar quando não manuseado ou mantido em condições ideais, portanto, os mais altos padrões biológicos devem ser empregados. Luvas descartáveis e pontas de pipeta sem RNase são essenciais para a amostragem de RNA. Para obter melhores resultados, apenas amostras adquiridas recentemente e extratos de RNA recém-preparados são adequados. Salvo indicação em contrário, as amostras e os extratos de RNA devem ser mantidos entre -20°C e -70°C por curtos períodos. O RNA extraído deve ser mantido no gelo durante a realização deste teste.

PROTOCOLO - REAÇÃO PCRun®

1. Limpe a área de trabalho para o ensaio com solução de hipoclorito a 3,5%, diluído com água numa proporção de 1:10.

2. Material para o ensaio:

- RNA extraído da amostra com Extrator RNA Nº 30PRE308
- Embalagem com os tubos de reação;
- Pipetas capilares para 20 µL de volume;
- Marcador de ponta fina;
- Pipetas calibradas e ponteiros com barreira para aerossol

3. Ligue o bloco de aquecimento e ajustar a 60°C. Assim que o bloco atingir a temperatura, prossiga.

4. Retire e destaque os tubos necessários para a reação PCRun® da embalagem. Oito tubos individuais estão ligados por um espaçador de plástico fino. Utilizando uma tesoura pequena e limpa, destacar o número necessário de tubos sem abrir as tampas. Tomar cuidado para retornar os tubos não utilizados para o envelope de alumínio e selar completamente com fita adesiva para manter um ambiente seco. 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.

5. Identifique os tubos com o número de cada amostra.

6. Abra cuidadosamente a tampa dos tubos de reação, um de cada vez. Com a micropipeta, pipete 15 µL do Buffer PCRun para o tubo de reação e incube a temperatura ambiente por 1 minuto, para permitir que o pellet se dissolva completamente.

7. Pipete 5 µL da amostra de RNA extraído com o Kit de Extração de RNA PCRun® e transfira-o para o tubo de reação. Bata suavemente o tubo de reação em uma superfície rígida dissolver bem o pellet;

8. Coloque o tubo de reação no orifício apropriado no bloco de aquecimento pré-aquecido (60 °C) e incube durante exatamente 1 hora. Não abra a tampa do tubo durante ou no final do período de incubação.

9. No final do período de incubação (1 hora), remova o tubo do bloco de aquecimento e imediatamente analise com o dispositivo de detecção de ácido nucleico.

REAÇÃO COM O DISPOSITIVO DE DETECÇÃO de RNA

É necessário um dispositivo de detecção de ácido nucleico descartável para cada amostra. Abrir e remover os componentes do dispositivo de detecção. O dispositivo é composto por duas peças de plástico, contendo no cartucho *amplicon* um bulbo com tampão e a câmara de detecção, contendo a tira de fluxo lateral (Fig. 1).

1. Verificar se o bulbo contém o tampão.

2. Identificar cada dispositivo com o número da amostra.

3. Fixar a seção da tampa do tubo de reação no espaço localizado ao lado do bulbo com tampão. Aplique uma leve pressão para prender o tubo de reação no cartucho *amplicon* (Fig. 1).

4. Feche bem o cartucho *amplicon*. Colocar o cartucho na câmara de detecção com o bulbo virado para baixo e para frente do dispositivo.

5. Empurrar a alavanca para baixo para travar o dispositivo.

6. Aguarde 15 minutos para ler os resultados. Resultados lidos após 30 minutos NÃO são válidos.

Fig. 1



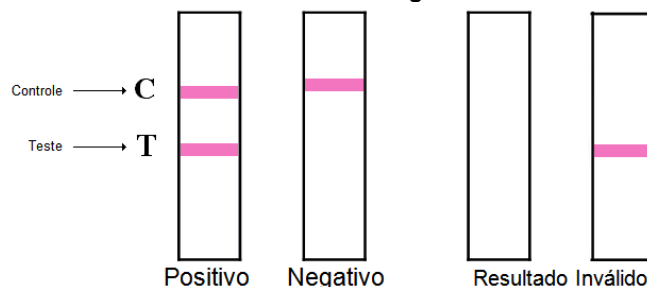
LEITURA E INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO

Para que o resultado seja válido, devem-se observar os seguintes requisitos (Fig. 2):

1. **Resultado Positivo** - Duas bandas aparecem, a linha de controle superior e a linha de ensaio inferior. O surgimento de ambas as linhas (a de controle e a linha do teste) indica a presença do RNA do vírus da cinomose.

2. **Resultado Negativo** - Uma única linha de controle aparece. A linha de controle deve aparecer independentemente de um resultado positivo ou negativo. O teste será inválido se a linha de controle não estiver presente. O aparecimento somente da linha controle indica apenas a ausência do RNA do vírus da cinomose ou que o número de cópias está abaixo do limite de detecção.

Fig. 2



LIMITAÇÕES

Como acontece com qualquer teste de diagnóstico, o resultado do PCRun® deve ser interpretado tendo em conta todos os dados clínicos e laboratoriais.

REFERÊNCIAS

1. Canine Distemper Virus. WASAVA Clinical Brief Nov 2014. S. Techangamsuwan and M.A. Kennedy.
2. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. J. virol Methods. 2006 Sept;136(1-2):171-176. Elia, Buonavoglia et al.
3. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction method for detection of Canine distemper virus modified live vaccine shedding for differentiation from infection with wild-type strains. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2014, Vol. 26(1) 27-34 2014. Wilkes, Kennedy et al.



Importador e Distribuidor Exclusivo:

JMR Trading Ltda/VP Diagnóstico. CNPJ: 11.857.347/0001-71
Registro no MAPA: PR 000017-5
Rua Mandaguari, 1752, Pinhais, PR. Brasil, CEP: 83.325-015
Resp Téc.: Margareth Carvalho S. Agottani (CRMV-PR 3288)
SAC: info@vpdiagnostico.com.br / www.vpdiagnostico.com.br
PRODUTO PARA USO VETERINÁRIO – NÃO NECESSITA DE REGISTRO



Fabricante:

Biogal Galed Labs
Kibbutz Galed, 1924000
Tel: +972-4-9898605
www.biogal.com