



PCRRun™

Kit para Detecção Molecular de DNA de *Ehrlichia canis* em cães

Somente para uso Veterinário e *In vitro*

SKU30CEH104 **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 de *Ehrlichia canis* em DNA isolado de **sangue total e medula óssea** usando um kit de extração de DNA nº30 PRE104. 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 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 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 DNA em uma área separada da área utilizada para a reação PCRRun

INFORMAÇÕES

A *Ehrlichia* é uma bactéria intracelular Gram-negativa com tropismo para células hematopoiéticas. A Eritiquiose Monocítica Canina (EMC) é causada principalmente por *E. canis* e seu principal vetor é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*¹. A EMC é uma doença potencialmente fatal que requer diagnóstico precoce para iniciar a terapia correta necessária para um bom prognóstico. A eritiquiose é caracterizada por um período de incubação de 8 a 20 dias, seguido por fases agudas, subclínicas e, em alguns casos, crônicas. A trombocitopenia é considerada a anormalidade hematológica mais comum e consistente de cães infectados com *E. canis*, mas a doença pode apresentar uma ampla variedade de sinais clínicos, como depressão, letargia, perda de peso, anorexia, pirexia, linfonodomegalia, esplenomegalia e diátese hemorrágica. Trombocitopenia, anemia leve e leucopenia leve são aparentes durante o estágio agudo; trombocitopenia leve no estágio subclínico; e pancitopenia na fase crônica grave. Hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipergamaglobulinemia são as principais anormalidades bioquímicas².

Cães com sinais clínicos leves ou na fase aguda da doença apresentam melhora nos parâmetros clínicos e hematológicos dentro de 24 a 48 horas após o início da terapia, enquanto cães com Eritiquiose crônica têm um prognóstico ruim.

DIAGNÓSTICO

Os testes diagnósticos incluem exame microscópico de esfregaços sanguíneos, anticorpo fluorescente indireto (IFA), ensaio imunoenzimático, ImmunoComb (titulação de anticorpos IgG) e análise molecular, como reação em cadeia da polimerase (PCR). É necessária experiência para identificar microscopicamente corretamente a presença de mórulas nos monócitos sanguíneos. As inclusões de patógenos são transitórias, mas se observadas, um diagnóstico pode ser confirmado.

Os anticorpos séricos são detectados 7 dias após a infecção inicial, mas alguns cães podem não se tornar soropositivos até 28 dias após a infecção. Os sinais clínicos da doença geralmente ocorrem antes do desenvolvimento de anticorpos séricos e, em alguns casos, quando cães infectados agudamente são imunossuprimidos, os resultados dos testes de anticorpos podem ser negativos. Os títulos séricos refletem a quantidade de anticorpos presentes em uma amostra de soro; no entanto, os títulos nem sempre se correlacionam com a duração da infecção ou a gravidade da doença. Deve-se notar que anticorpos elevados para *Ehrlichia* são uma forte indicação de exposição ao patógeno. A análise molecular de PCRRun® pode detectar doenças clínicas antes da soroconversão. É consenso do American College of Veterinary Internal Medicine que a análise molecular deve ser usada em conjunto com a sorologia para o diagnóstico inicial de Eritiquiose em animais não tratados. Além disso, a reação em cadeia da polimerase deve ser empregada para monitorar os estágios do tratamento e após a terapia antimicrobiana³.

CONTEÚDO DO KIT

Conteúdo	Quantidade
Tira PCRRun® de 4 tubos de reação simples com <i>pellets</i> liofilizados	1
Embalagem de alumínio com o dispositivo de detecção de ácido nucleico descartável.	4
Pipetas capilares de plástico - 20 µL*	5

* Pipetas calibradas e ponteiras com barreira para aerossol podem ser usada no lugar das pipetas de plástico.

EQUIPAMENTOS E SOLUÇÕES NECESSÁRIOS:

- Biogal PCRRun® Extrator de DNA da Amostra
- Bloco de aquecimento a 60 °C compatível com tubos de 0,2 mL para PCR.
- Bloco de aquecimento (é comercializado pela Biogal)
- Temporizador
- Tesoura
- Caneta marcadora permanente de ponta fina
- Luvas descartáveis

COLETA, ESTOCAGEM E TRANSPORTE

O kit é adequado para detectar ácido nucleico extraído de 50 µL de sangue total e medula óssea usando o Kit de Extração Rápida de DNA PCRRun® Sample Prep (Cat No. 30PRE104). As amostras de sangue de preferência coletadas em EDTA. Os anticoagulantes sanguíneos têm uma consequência substancial nas reações de PCR, portanto, é imperativo que o volume ideal de sangue seja coletado conforme indicado no tubo. Para obter melhores resultados, amostras adquiridas recentemente e extratos de DNA recém-preparados são recomendados para uso com o kit PCRRun®.

A menos que recomendado de outra forma, amostras e extratos de DNA podem ser mantidos a 2-8°C por até 24 horas ou -20°C por um período maior.

PROTOCOLO - REAÇÃO PCRRun®

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:

- DNA extraído da amostra com o Extrator de DNA nº30PRE104
- Embalagem com os tubos de reação;
- Pipetas capilares para 20 µL de volume;
- Marcador de ponta fina;

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 PCR[®] da embalagem. Quatro 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 pipeta capilar descartável de 20 µL, pipete 20 µL do DNA extraído com o Kit de Extração de DNA PCR[®] e transfira-o para o tubo de reação. Confira se todo o conteúdo da pipeta capilar foi transferido corretamente ao tubo. Bata suavemente o tubo de reação em uma superfície rígida para trazer todo o fluido para o fundo do mesmo. Incube o tubo em temperatura ambiente por 1 minuto para permitir que o *pellet* se dissolva completamente.

7. 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.

8. 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 DNA

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. Leia os resultados em 15 minutos. Resultados lidos após 30 minutos são inválidos

FIG.1

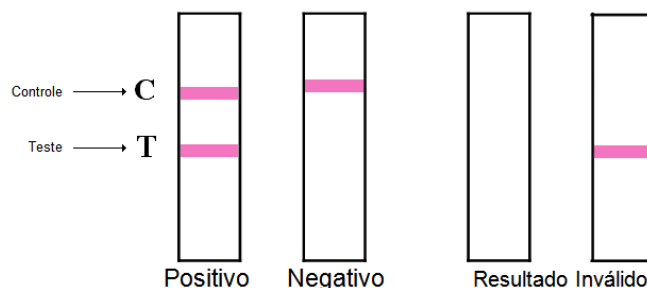


LEITURA E INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO

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 DNA de *Ehrlichia canis*.
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 do controle não estiver presente. O aparecimento somente da linha controle indica apenas a ausência do DNA de *Ehrlichia canis* 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 PCR[®] deve ser interpretado tendo em conta todos os dados clínicos e laboratoriais.

SENSIBILIDADE

Este teste pode detectar 10³ cópias do gene alvo no DNA purificado.

REFERÊNCIAS

1. Human Ehrlichiosis and Anaplasmosis. Ismail, Nahed, Karen C. Bloch, and Jere W. McBride. Clinics in Laboratory Medicine 30.1 (2010): 261-92
2. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine Ehrlichiosis. Waner T., Harrus S., Weiss D. J., Bark H., Keysary A. (1995) Vet. Immunol. Immunopathol. 48:177-182.
3. Consensus Statement on Ehrlichial Disease of Small Animals from the Infectious Disease Study Group of the ACVIM T. Mark Neer, Edward B. Breitschwerdt, Russell T. Greene, and Michael R. Lappin. J Vet Intern Med 2002;16:309-315



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