



PCRRun™

Kit para Detecção Molecular de *Mycoplasma Felino*

Somente para uso Veterinário e *In vitro*

SKU30FMH104

Instruções de uso

FINALIDADE

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

PRINCÍPIO

O PCRRun® é usado para detecção qualitativa de *Mycoplasma haemofelis* em DNA **isolado de sangue total de felinos**, de preferência com EDTA. Este kit foi desenvolvido para ser utilizado com amostra de DNA extraído com o kit de extração de DNA PCRRun® nº 30PRE104 e um bloco de aquecimento compatível.

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

Os micoplasmas hemotrópicos são bactérias parasitas Gram negativas sem paredes celulares e que têm afinidade com as membranas externas dos eritrócitos. Três espécies foram identificadas em gatos: *M. haemofelis*, *candidateatus* *M. haemominutum* e *Candidateatus M. turicensis*1. *Mycoplasma haemofelis* (anteriormente classificado como *Haemobartonella felis*) é considerado o agente causador da Anemia Infecciosa Felina hemolítica (FIA). O organismo aparece em esfregaços de sangue como pequenos corpos cocóides (0,3–0,8 µm), às vezes formando cadeias curtas de 3 a 6 organismos. A anemia hemolítica causada por *M. haemofelis* é geralmente de natureza regenerativa, a menos que essa resposta regenerativa seja suprimida por uma doença subjacente, como a infecção pelo vírus da leucemia felina. A parasitemia é episódica e está diretamente associada à diminuição dos níveis de hematócrito no momento do aumento da carga parasitária. Devido à parasitemia cíclica, os organismos podem ser numerosos, raros ou indetectáveis em uma determinada amostra de sangue. A transmissão pode ocorrer por meio de vetores artrópodes, como piolhos, pulgas, carrapatos e mosquitos, bem como por transferência de sangue infectado (transfusões de sangue ou uso de agulhas ou instrumentos

cirúrgicos contaminados). Infecção vertical e transmissão direta associada a comportamento agressivo entre gatos foram relatadas. A maioria dos gatos infectados com *M. haemofelis* torna-se portadores assintomáticos e apresentam sinais clínicos mais leves da doença quando estão sob estresse.²

DIAGNÓSTICO

Os sintomas diagnósticos incluem membranas mucosas pálidas, esplenomegalia, letargia, anorexia, depressão, perda de peso e fraqueza. O diagnóstico precoce e a terapêutica adequada são fundamentais para um bom prognóstico. A confirmação laboratorial é tradicionalmente realizada pela avaliação citológica dos eritrócitos. Resultados falsos negativos podem ocorrer, pois o número de células infectadas oscila rapidamente e a infecção pode ser facilmente perdida. Um olho experiente é necessário para diferenciar adequadamente os organismos *Mycoplasma* de artefatos em lâminas mal coradas; por esse motivo, resultados falsos positivos são comuns. Os organismos se desprendem dos eritrócitos em amostras envelhecidas (aprox. 24 horas) e podem ser interpretados como precipitados de manchas, levando a diagnósticos incorretos. As reações em cadeia da polimerase (PCR), como o PCRRun®, foram desenvolvidas com maior especificidade e sensibilidade do que o método subjetivo de identificação microscópica de esfregaço sanguíneo. As 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 parasitemia³.

CONTEÚDO DO KIT

Conteúdo	Quantidade
4 tiras com reagentes liofilizados	1
Embalagem de alumínio com detector de ácido nucleico	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 (comercializado pela Biogal)
- Temporizador
- Tesoura
- Caneta marcadora permanente de ponta fina
- Luvas descartáveis

COLETA, ESTOCAGEM E TRANSPORTE

O kit é utilizado para a detecção do ácido nucleico extraído de 50 µL de sangue total, utilizando reagentes para extração rápida de DNA do Kit de Extração nº30PRE104. As amostras de sangue, devem ser colhidas de preferência com EDTA. 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, use sempre amostras frescas e DNA recém-extraído. Se não for possível, as amostras e o DNA podem ser mantidos de 2 a 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 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;



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

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

4. Retirar e destacar os tubos necessários para a reação PCRun® 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 a embalagem 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. Identificar os tubos com o número de cada amostra.

6. Abrir cuidadosamente a tampa dos tubos de reação, um de cada vez. Com a pipeta capilar descartável de 20 µL, pipetar 20 µL do DNA extraído com o Kit de Extração de DNA PCRun® e transferi-lo 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. Colocar o tubo de reação no orifício apropriado no bloco de aquecimento pré-aquecido (60 °C) e incubar durante exatamente 1 hora. Não abrir a tampa do tubo durante ou no final do período de incubação.

8. No final do período de incubação (1 hora), remover o tubo do bloco de aquecimento e imediatamente analisar com o dispositivo de detecção de ácido nucleico.

REAÇÃO COM O DISPOSITIVO DE DETECÇÃO de DNA para 4 amostras

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 aos 15 minutos. Resultados lidos depois de 30 minutos são inválidos.

FIG. 1



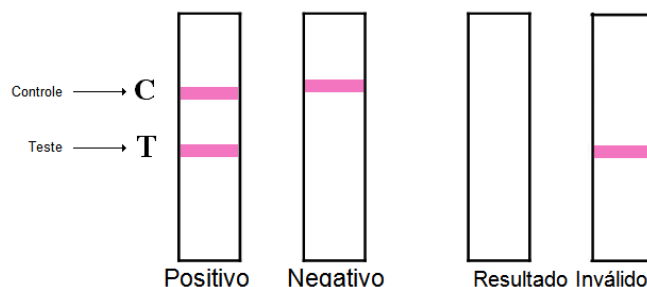
LEITURA E INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO

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 de *Mycoplasma haemofelis*.

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 *Mycoplasma haemofelis* 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.

SENSIBILIDADE

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

REFERÊNCIAS

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

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 Carvalo 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. 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