

IMUNOTESTE

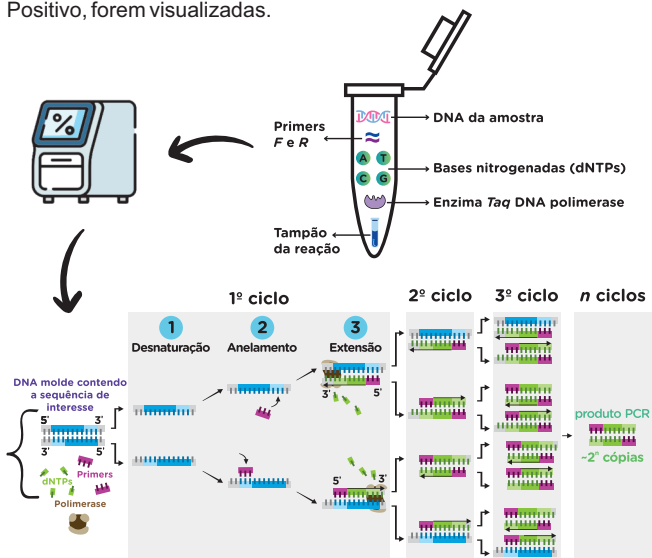
Anaplasma platys (PCR CONVENCIONAL) - Canino

Kit para Detecção *in vitro* do DNA de *Anaplasma platys* por Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR Convencional)

USO VETERINÁRIO

DESCRIÇÃO DO PRODUTO:

O kit detecta a presença do DNA da bactéria *Anaplasma platys* após a extração do DNA total de amostra de sangue canino com suspeita da doença. Trata-se, portanto, de um teste qualitativo e não quantitativo, utilizando a nested de PCR (nPCR). A reação é realizada em pequenos tubos de 0,2 mL e em um termociclador. Dentro do termociclador a reação irá atingir as temperaturas adequadas de cada ciclo para que funcione corretamente. Geralmente a PCR constitui 3 etapas generalizadas como: Desnaturação (94-98 °C), Anelamento (50-65 °C) e Extensão (72 °C). Após vários ciclos de desnaturação, anelamento e extensão são produzidos milhões de cópias de DNA. O resultado dessa reação deve ser visualizado em gel de eletroforese. A reação oriunda do termociclador deverá ser aplicada em um gel de agarose, no qual as moléculas de DNA migrarão de acordo com o tamanho. Nesse protocolo, em específico, em casos de resultados positivos, deve-se identificar uma banda de 386 pares de base, similar ao do Controle Positivo. No caso de resultados negativos, nenhuma banda deve ser visualizada. Além disso, deve-se considerar amostra negativa, quando outras bandas de tamanhos diferentes do Controle Positivo, forem visualizadas.



INDICAÇÃO:

Este produto destina-se a detecção molecular do DNA de *Anaplasma platys* pelo Método Convencional da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

COMPOSIÇÃO DO KIT:

- a) 01 tubo com 1.166 µL de mix PCR *A. platys*;
- b) 01 tubo com 432 µL de oligomix-1 PCR *A. platys*;
- c) 01 tubo com 432 µL de oligomix-2 PCR *A. platys*;
- d) 02 tubos com 1.600 µL cada de água livre de DNase;
- e) 01 tubo com 35 µL controle positivo (CP);
- f) 01 tubo com 35 µL controle negativo (CN)

MATERIAIS NECESSÁRIOS PARA A REALIZAÇÃO DO TESTE E NÃO FORNECIDOS NO KIT:

1. Kit para extração de DNA;
2. Termociclador de PCR convencional;
3. Micropipetas de precisão devidamente limpas (de preferência com hipoclorito);
4. Ponteiras com filtro, estéreis e livres de DNase;
5. Microtubos de 0,2 mL, 0,6 mL e 1,5 mL, estéreis e livres de DNase;
6. Minicentrífuga de microtubos;
7. Centrífuga de microplacas;
8. Agitador tipo vórtex;
9. Equipamentos de proteção individual (máscara, avental e luvas sem pó, descartáveis);
10. Equipamentos e consumíveis para eletroforese.

USO DE PARAMENTAÇÃO:

Durante a realização dos testes recomenda-se que o colaborador esteja paramentado com avental de manga longa, luva descartável, máscara e touca.

ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE:

Armazenar e transportar o kit à -20 °C. **Descongelar os componentes do kit, por no máximo, seis vezes cada.**

OBS.: O kit foi testado uma vez ao mês durante seis meses e manteve o desempenho em todas as reações. Portanto, desde que seja respeitado o prazo de validade, transporte adequado e os ciclos máximos de descongelamentos, o kit continuará a manter sua sensibilidade e especificidade originais.

PRECAUÇÕES:

1. O produto deve ser utilizado somente para a detecção *in vitro* do DNA de *A. platys*;
2. O produto deve ser utilizado dentro do prazo de validade determinado pelo fabricante;
3. Recomenda-se o uso de paramentação durante o uso do kit, conforme já mencionado em item anterior;
4. Recomenda-se utilizar o kit dentro de fluxo laminar;
5. Recomenda-se limpar a bancada do fluxo e pipetas com solução de hipoclorito e após, com solução de álcool a 70 % ou solução descontaminante para DNA e RNA;
6. Recomenda-se que, a extração do DNA seja realizada em local diferente ao da realização de PCR, para evitar riscos de contaminação com material genético oriundo de outras reações;
7. Recomenda-se muito cuidado ao manipular o controle positivo para que não contamine os outros poços, tampouco o ambiente de trabalho. Para isso, seria importante, no passo de colocar as amostras de DNA extraídas, assim como o controle positivo, utilizar outro local e outras micropipetas, se possível;
8. O laboratorista, deve manusear e armazenar o kit seguindo corretamente as instruções contidas na bula. A IMUNODOT diagnósticos, não se responsabiliza pelos resultados obtidos, caso o manipulador não siga as recomendações do fabricante.

PROCEDIMENTOS PARA USO DO PRODUTO

1. Processamento das amostras-teste:

As amostras-teste devem ser submetidas à extração de DNA utilizando-se kits de extração específicos, seguindo as recomendações do fabricante. Alternativamente, outros protocolos podem ser utilizados (ex.: fenol-clorofórmio). É necessário, destacar que, a qualidade do processo de extração pode impactar os resultados do teste de PCR. Após a extração, recomenda-se armazenar as amostras de DNA à -20 °C até o momento da sua utilização.

2. Controles positivo e negativo:

Os controles positivos e negativos são fornecidos pelo kit, e devem ser manuseados com o máximo de cuidado. Rever item "Precauções". Os controles devem ser mantidos à -20 °C até o momento da sua utilização.

3. Preparo da mistura de reação:

O kit IMUNOTESTE – *Anaplasma platys* (PCR CONVENCIONAL) inclui reagentes para realização de 96 reações de 25 µL, dos quais 5 µL correspondem à amostra teste ou controles. O volume da mistura de reação deve ser preparado de acordo com o número de amostra a se testar, além dos controles positivo e negativo. A mistura da reação deve ser preparada seguindo o procedimento apresentado abaixo:

- a. Retirar os reagentes fornecidos pelo kit do freezer e deixar descongelando, preferencialmente, em gelo ou em suporte refrigerado (*PCR-Cooler*);
- b. Após o descongelamento, todos os reagentes devem ser homogeneizados e centrifugados brevemente;
- c. Separar um microtubo de 0,6 ou 1,5 mL, de acordo com o volume de mistura a ser preparada e identificar como “mix”. Este microtubo será utilizado para acondicionar os reagentes da reação;
- d. Acrescentar ao microtubo “mix” os componentes listados na tabela a seguir, com os ajustes necessários em função do número de amostras que serão analisadas:

Tabela 1. Volumes de cada reagente a serem adicionados para o preparo da mistura da 1ª reação.

Insumos para reação da mix	Volume para uma (1) reação	Volume para 96 reações
Água	12,6 µL	1.209,6 µL
Mix PCR <i>A. platys</i>	5,4 µL	518,4 µL
Oligomix-1 PCR <i>A. platys</i>	2,0 µL	192 µL

OBS: O kit contém acréscimo de 12,5 % em todos os insumos, além do volume necessário para realização das 96 reações.

- e. Uma vez adicionado todos os reagentes dentro do microtubo “mix”, ele deve ser homogeneizado e centrifugado brevemente;
- f. Com o auxílio de uma micropipeta, dispensar 20 µL da reação de mix por microtubo de 0,2 µL, previamente identificado. Se o número de amostra a ser analisada for maior que 30, recomenda-se utilizar uma placa de PCR;
- g. Fechar os microtubos e transportá-los para área de manipulação de DNA;

OBS.: O manipulador deve tomar cuidado redobrado durante a aplicação das amostras. Recomenda-se, demasiadamente abrir cuidadosamente e aplicar a amostra de DNA manuseando apenas um microtubo por vez.

- h. Dispensar 5 μL de DNA da amostra-teste em seu microtubo correspondente;
- i. Dispensar 5 μL do controle negativo em seu microtubo correspondente;
- j. Dispensar 5 μL do controle positivo em seu microtubo correspondente;
- k. Homogeneizar gentilmente os microtubos e centrifugá-los para garantir que todos os reagentes estejam no fundo do microtubo.

OBS.: Recomenda-se que, os passos desde a preparação da mix até a aplicação do DNA-teste, sejam realizados em suporte refrigerado.

l. Após realizar os passos anteriores (h, i, j e k), os microtubos devem ser levados ao termociclador para realização da PCR, seguindo as instruções descritas no **item 4**. Findo esse protocolo, o material amplificado nessa primeira reação servirá de molde para segunda reação. Esta segunda reação deverá ser realizada conforme descrito anteriormente (itens a – d), porém com pequenas alterações (Tabela 2).

Tabela 2. Volumes de cada reagente a serem adicionados para o preparo da mistura da 2^o reação.

Insumos para reação da mix	Volume para uma (1) reação	Volume para 96 reações
Água	16,6 μL	1.593,6 μL
Mix PCR A. platys	5,4 μL	518,4 μL
Oligomix-2 PCR A. platys	2,0 μL	192 μL

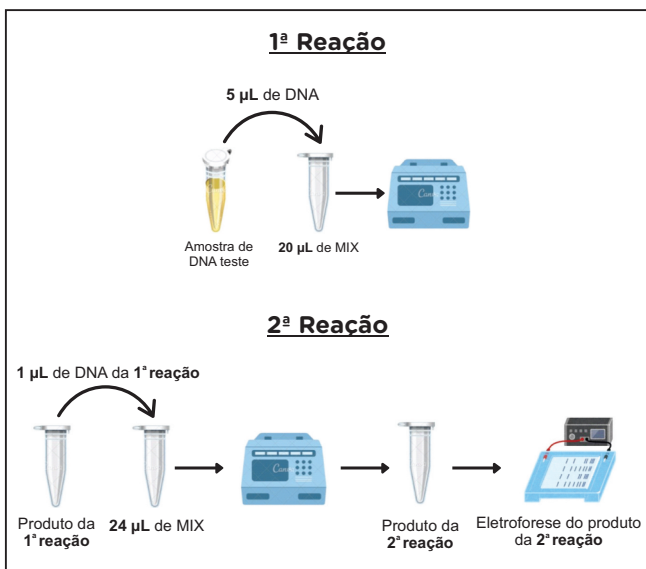
- m. Uma vez adicionado todos os reagentes dentro do microtubo “mix”, ele deve ser homogeneizado e centrifugado brevemente;
- n. Com o auxílio de uma micropipeta, dispensar **24 μL** da reação da mix por microtubo de 0,2 μL , previamente identificado. Se o número de amostra a ser analisada for maior que 30, recomenda-se utilizar uma placa de PCR;
- o. Fechar os microtubos e transportá-los para área de manipulação de DNA;

OBS.: O manipulador deve tomar cuidado redobrado durante a aplicação das amostras. Recomenda-se, demasiadamente abrir cuidadosamente e aplicar a amostra de DNA amplificado manuseando apenas um microtubo por vez.

- p. Dispensar **1 μL** do controle negativo amplificado na 1^o reação em seu microtubo correspondente;

- q. Dispensar **1 μL de DNA amplificado na 1^o reação (amostra-teste)** em seu microtubo correspondente (**Figura 1**);
- r. Dispensar **1 μL do controle positivo amplificado na 1^o reação** em seu microtubo correspondente;
- s. Homogeneizar gentilmente os microtubos e centrifugá-los para garantir que todos os reagentes estejam no fundo do microtubo.

Figura 1. Esquema demonstrando o passo a passo para realização da reação de nPCR.



4. Configuração do aparelho termociclador:

Ligar o equipamento e programar o protocolo para amplificação da 1^a região alvo de *A. platys*, como descrito a seguir: Desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos a 95 °C por 45 segundos, 52,5 °C por 45 segundos e 72 °C por 45 segundos. Por fim, extensão final a 72 °C por 7 minutos. Após, adicionar e salvar o protocolo no equipamento, colocar os microtubos e fechar a tampa. Em seguida, iniciar o protocolo de corrida. A 2^a reação deve ser realizada utilizando as mesmas condições descritas anteriormente, exceto pela temperatura de anelamento, que deve ser alterada para 57,5 °C.

VISUALIZAÇÃO DOS RESULTADOS:

1. Preparo e corrida em gel de agarose:

Os produtos amplificados por meio do ensaio de PCR devem ser submetidos à eletroforese. Recomenda-se preparar o gel de agarose a 1,0 %, corado com brometo de etídio (0,2 µL/mL) ou outros corantes fluoróforos para mesma finalidade. As amostras podem ser corridas em tampão TEB, pH 8,0 (8,9 mM Tris-base; 8,9 mM ácido bórico; 0,25 mM EDTA). A eletroforese pode ser realizada a 90V/150mA durante 40 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados, é necessário que as amostras sejam analisadas simultaneamente com um marcador de peso molecular, preferencialmente de 100 pares de base. Após a separação das bandas de DNA, o gel de agarose deve ser levado ao transiluminador, para visualização dos resultados.

2. Interpretação dos resultados:

Inicialmente, para considerar a eletroforese válida, o controle positivo deve apresentar uma “banda” de 386 pares de base. Por outro lado, o controle negativo não deve apresentar bandas. A presença de bandas no controle negativo, principalmente aquelas com o mesmo peso molecular do controle positivo, indica contaminação. A amostra-teste será considerada positiva para DNA de *A. platys* se a mesma, apresentar banda na altura do controle positivo. No caso de resultados negativos, nenhuma banda deve ser visualizada. Além disso, deve-se considerar amostra negativa, quando outras bandas de tamanhos diferentes do Controle Positivo, forem visualizadas.

DESEMPENHO:

Os ensaios para análise de sensibilidade do kit IMUNOTESTE – *Anaplasma platys* (PCR CONVENCIONAL) mostraram que o limite mínimo de detecção da região alvo é de 10^2 cópias de DNA na primeira reação e 10^1 cópias na segunda reação.

INTERFERENTES E LIMITAÇÕES:

IMUNOTESTE – *Anaplasma platys* (PCR CONVENCIONAL) não apresenta resultados falso-positivos na presença de DNA de *Ehrlichia canis*, *Leishmania infantum* e *Babesia vogeli*. Apesar de ter proporcionado um grande avanço no diagnóstico, os ensaios de PCR podem sofrer interferência de alguns inibidores. Dentre esses inibidores, podemos destacar a imunoglobulina G (IgG), grupo heme,

fenol, etanol e excesso de sais (KCl e NaCl). Esses inibidores podem interferir na atividade da DNA polimerase e interagir com o DNA.

DESCARTE:

Todo material utilizado durante os testes e os resíduos gerados devem ser descartados em lixeira apropriada para material infectante (lixo biológico).

Isento de Registro, conforme artigo 44, inciso XVI do Decreto nº 5.053 de 22 de abril de 2004.



PROPRIETÁRIO E FABRICANTE:

Imunodot Diagnósticos Ltda

Rua Dr. Mário de Campos, 1150 • Jardim São Marcos I

CEP: 14887-200 • Jaboaticabal/SP

Contato: (16) 3203 8847

E.mail: contato@imunodot.com.br

www.imunodot.com.br

CNPJ/MF nº 05.870.841/0001-73

RESPONSÁVEL TÉCNICO:

Celio Raimundo Machado – CRMV/SP nº 2812