

# IMUNOTESTE

## *Anaplasma platys* (PCR CONVENCIONAL) - Canino

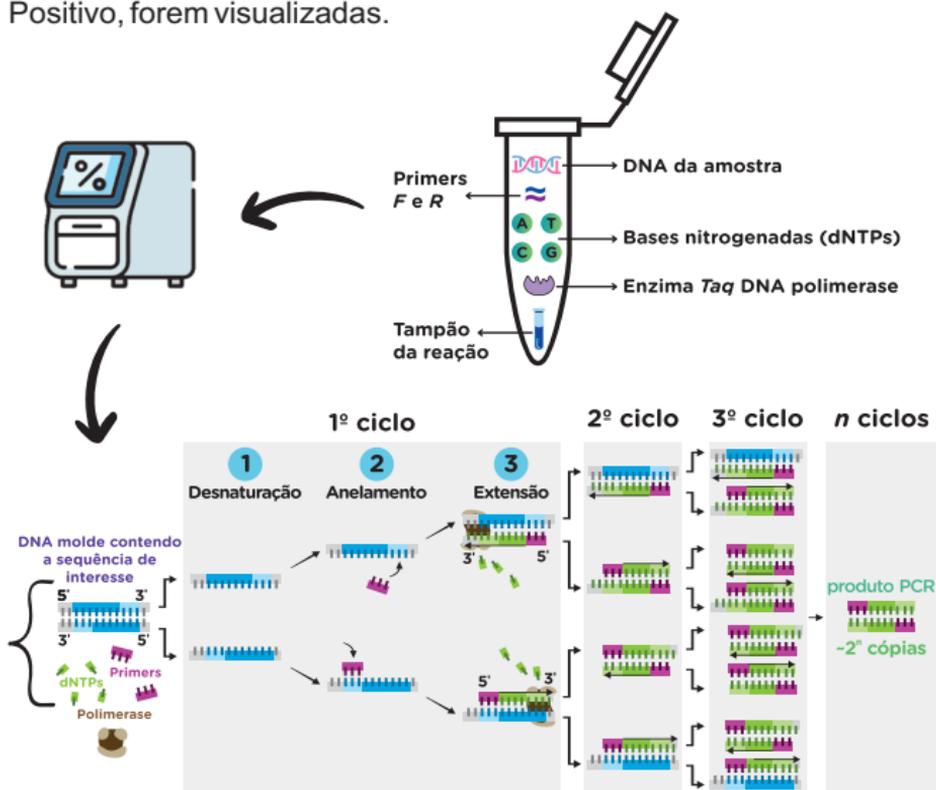


### Kit para Detecção *in vitro* do DNA de *Anaplasma platys* por Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR Convencional)

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  $\mu\text{L}$  de DNA da amostra-teste em seu microtubo correspondente;
- i. Dispensar 5  $\mu\text{L}$  do controle negativo em seu microtubo correspondente;
- j. Dispensar 5  $\mu\text{L}$  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<sup>o</sup> reação.

Insumos para reação da mix	Volume para uma (1) reação	Volume para 96 reações
Água	16,6 $\mu\text{L}$	1.593,6 $\mu\text{L}$
Mix PCR A. platys	5,4 $\mu\text{L}$	518,4 $\mu\text{L}$
Oligomix-2 PCR A. platys	2,0 $\mu\text{L}$	192 $\mu\text{L}$

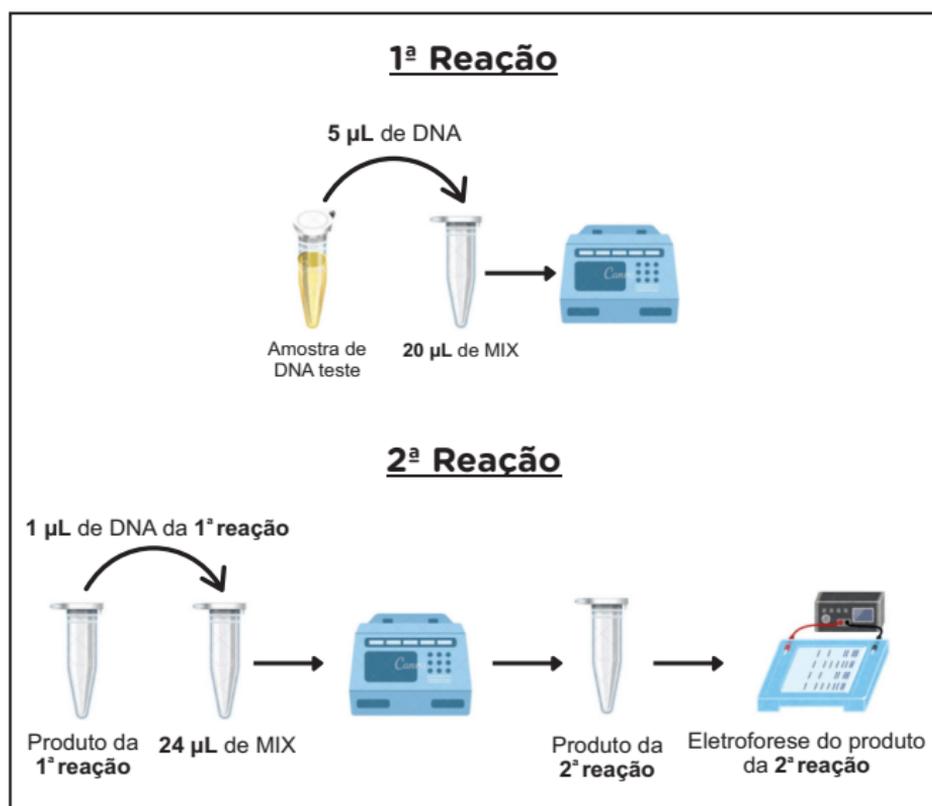
- m. Uma vez adicionado todos os reagentes dentro do microtubo “mix”, ele deve ser homogeneizado e centrifugado brevemente;
- n. Com o auxílio de uma micropipeta, dispensar **24  $\mu\text{L}$**  da reação da mix por microtubo de 0,2  $\mu\text{L}$ , previamente identificado. Se o número de amostra a 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  $\mu\text{L}$**  do controle negativo amplificado na 1<sup>o</sup> reação em seu microtubo correspondente;

- q. Dispensar **1  $\mu\text{L}$  de DNA amplificado na 1<sup>o</sup> reação (amostra-teste)** em seu microtubo correspondente (**Figura 1**);
- r. Dispensar **1  $\mu\text{L}$  do controle positivo amplificado na 1<sup>o</sup> 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<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> 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](mailto:contato@imunodot.com.br)

[www.imunodot.com.br](http://www.imunodot.com.br)

CNPJ/MF nº 05.870.841/0001-73

### **RESPONSÁVEL TÉCNICO:**

Celio Raimundo Machado – CRMV/SP nº 2812