

BIO GENE VET

Ehrlichia PCR

Instrução de uso

REF G013-4

Revisão: Julho/2021

Bioclin · QUIBASA

ÍNDICE

Finalidade	3
Princípio de Ação	3
Apresentação	3
Reagentes	4
Equipamentos e Insumos Operacionais	4
Condições de Armazenamento e Transporte	4
Cuidados Especiais	5
Amostras	6
Procedimento	6
A . Extração do DNA	6
B . Preparo dos Reagentes	7
C . Diluição dos Padrões Quantitativos	8
D . Preparo da PCR	8
E . Definições do termociclador para a PCR em Tempo Real	9
F . Validação do Resultado	11
G . Interpretação do resultado	12
Limitações do Processo	12
Sensibilidade Analítica	12
Significado Clínico	13
Referências Bibliográficas	13
Atendimento ao Consumidor	14
Simbologia Universal	15

FINALIDADE

Teste para detecção quantitativa do DNA de espécies do gênero *Ehrlichia* em amostras biológicas através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Produto de uso exclusivo em Pesquisa (**RUO – Research Use Only**). Para outras finalidades, seguir as orientações preconizadas nas legislações aplicáveis.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

O kit **Bio Gene Vet Max Ehrlichia PCR** é um ensaio *in vitro* baseado na detecção quantitativa do DNA de espécies do gênero *Ehrlichia* através da PCR em tempo real.

O método de PCR em Tempo Real é usado para amplificar o DNA do patógeno. Um termociclador de PCR em Tempo Real é usado para amplificar e detectar a sonda fluorescente. O software do aparelho calcula a concentração de DNA do patógeno expressa em cópias/ μL , utilizando a curva padrão gerada a partir do padrão quantitativo contido no kit.

APRESENTAÇÃO

Reagente	Apresentação
	Bio Gene Vet Max Ehrlichia PCR
	100 Testes
R1	1 x 110 μL *
R2	1 x 1,1 mL *
R3	1 x 1,5 mL
R4	1 x 500 μL *
R5	1 x 1,5 mL
R6	1 x 1,5 mL
R7	1 x 110 μL *
R8	1 x 500 μL *

*Reagentes liofilizados. Os volumes descritos acima correspondem ao volume final após a ressuspensão dos reagentes, conforme descrito no item PROCEDIMENTO, subitem B. (Preparo dos Reagentes).

REAGENTES

R1. Solução PCR: Primer, Sonda, TRIS-HCl.

R2. Mix Taq: Polimerase, dNTPs, $MgCl_2$, Estabilizantes.

R3. Tampão Mix: TRIS-HCl.

R4. Padrão A (2×10^5 cópias/ μL): Plasmídeo, TRIS-HCl, EDTA.

R5. Diluente: TRIS-HCl, EDTA.

R6. Água: Água livre de DNase/RNase.

R7. Solução PCR Cl: Primer, Sonda, TRIS-HCl.

R8. Controle Interno: Plasmídeo, TRIS-HCl.

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS**Materiais contidos no kit:**

- Reagentes descritos no quadro anterior.
- Instrução de uso (manual).

Materiais necessários, mas não contidos no kit:

- 1- Sistema ótico programável de detecção de fluorescência (Termociclador Real-time PCR);
- 2- Capela de fluxo laminar;
- 3- Tubos de centrifuga de 1,5 mL;
- 4- Tubos ou placas para PCR;
- 5- Luvas de látex descartáveis livres de pó ou material similar;
- 6- Microcentrifuga;
- 7- Vórtex;
- 8- Micropipetas e ponteiros estéreis com filtro (0,5-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL);
- 9- Kit para extração de ácidos nucléicos;

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento é de -20°C (-10 a -30°C).

Após a ressuspensão dos reagentes liofilizados, o produto é estável por 6 meses a partir da data de ressuspensão.

Deve-se evitar o congelamento e descongelamento. O transporte pode ser feito em temperaturas entre 2 e 30°C por 7 dias. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

CUIDADOS ESPECIAIS

- 1-** Produto de uso exclusivo em Pesquisa (**RUO – Research Use Only**). Para outras finalidades, seguir as orientações preconizadas nas legislações aplicáveis.
- 2-** Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos;
- 3-** Manusear e descartar todas as amostras biológicas, reagentes e materiais utilizados para realização do ensaio como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite contato direto com as amostras biológicas e os reagentes. Evitar derrames ou aerossol. Os resíduos devem ser manuseados e descartados de acordo com as medidas de segurança adequadas.
- 4-** Procedimentos de biologia molecular, tais como a extração de ácidos nucleicos, transcrição reversa, amplificação e detecção requerem pessoal qualificado para evitar o risco de resultados errados, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos contidos nas amostras ou contaminação da amostra por produtos de amplificação.
- 5-** É necessário dispor de áreas separadas para a extração/preparação de reações e para a amplificação/detecção de produtos. Nunca introduzir um produto de amplificação na área destinada para a extração ou preparação de produtos de amplificação.
- 6-** Todas as amostras e reagentes devem ser manipulados sob uma capela de fluxo laminar. As pipetas devem ser usadas com ponteiros com filtro. As ponteiros empregadas devem ser estéreis, livres de DNases e RNases.
- 7-** Evitar o congelamento e descongelamento repetido dos reagentes.
- 8-** Armazenar as amostras de DNA a -20°C, caso não forem utilizadas imediatamente.
- 9-** Não usar o kit após a data de validade.
- 10-** Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.
- 11-** Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) disponibilizadas no site www.bioclin.com.br ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.

12- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.

13- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

AMOSTRAS

Este kit deve ser utilizado com amostras de DNA extraídas de sangue. Outros tipos de amostra podem ser utilizados de acordo com recomendações médicas ou do próprio laboratório.

As amostras devem ser coletadas de acordo com as recomendações do laboratório para testes moleculares. Devem ser transportadas e armazenadas entre 2 e 8°C por até 3 dias¹.

Utilizar amostras de DNA adequadas à amplificação por PCR com pureza e concentração adequadas. Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido.

PROCEDIMENTO

A. Extração do DNA

Os ácidos nucleicos (DNA) das amostras devem ser extraídos seguindo as instruções de uso do kit escolhido. Para o controle do processo de extração, o **Controle Interno (R8)** deve ser preparado (vide item B.4) e adicionado às amostras durante a extração, conforme descrito abaixo:

1- Adicionar 4µL do **Controle Interno (R8)** a cada tubo contendo as amostras já ressuspendidas em tampão de extração / lise.

2- Completar o processo de extração de acordo com as instruções de uso do kit de extração.

OBS.: Nunca adicionar o **Controle Interno (R8)** diretamente à amostra biológica pura, pois pode resultar em degradação do mesmo.

B. Preparo dos reagentes

Os reagentes **R4** e **R8** contém molde de DNA, e eles devem ser manipulados (ressuspendido) em área apropriada para evitar a contaminação dos demais reagentes.

1- Centrifugar (pulso spin) os reagentes **Solução PCR (R1)**, **Solução PCR CI (R7)**, **Padrão A (R4)** e **Controle Interno (R8)** antes da abertura dos microtubos.

2- Ressuspender o reagente **Mix Taq (R2)*** com 1,1 mL do reagente **Tampão Mix (R3)**.

**O Mix taq (R2) não contém fluoróforo de referência passiva (ROX).*

3- Ressuspender os reagentes, **Solução PCR (R1)** e **Solução PCR CI (R7)** com o reagente **Água (R6)** de acordo com a tabela abaixo:

Reagente	Apresentação
	100 Testes
Solução PCR (R1)	110 µL
Solução PCR CI (R7)	110 µL

4- Ressuspender os reagentes, **Padrão A (R4)** e **Controle Interno (R8)** com o reagente **Diluyente (R5)** de acordo com a tabela abaixo:

Reagente	Apresentação
	100 testes
Padrão A (R4)	500 µL
Controle Interno (R8)	500 µL

C. Diluição dos Padrões Quantitativos*

1- Separar 3 microtubos (não fornecidos no kit) adequados para a diluição seriada do **Padrão A (R4)**.

2- Pipetar 90µL do **Diluyente (R5)** em cada microtubo e nomeá-los como B, C e D respectivamente.

3- Em seguida, pipetar 10µL do **Padrão A (R4)** no microtubo B e homogeneizar.

4- Trocar a ponteira e pipetar 10µL do microtubo B no microtubo C e homogeneizar.

5- Trocar a ponteira e pipetar 10µL do microtubo C no microtubo D e homogeneizar.

6- No final da diluição temos padrões A, B, C e D com as seguintes concentrações:

Padrão A – 2×10^5 cópias/µL

Padrão B – 2×10^4 cópias/µL

Padrão C – 2×10^3 cópias/µL

Padrão D – 2×10^2 cópias/µL

**A diluição da curva padrão deve ser realizada para o teste quantitativo.*

D. Preparo da PCR

1- Separar previamente os microtubos/poços a serem utilizados, de acordo com o número de amostras, Controles e Padrões Quantitativos a serem analisados.

2- Preparar o volume da solução de PCR final de acordo com o número de reações a ser realizadas.

Reagentes	1 Reação	25 Reações	50 Reações	100 Reações
Mix Taq (R2)	10µL	250µL	500µL	1mL
Solução PCR (R1)	1µL	25µL	50µL	100µL
Solução PCR CI (R7)	1µL	25µL	50µL	100µL
Água (R6)	3µL	75µL	150µL	300µL

Para o preparo de número de reação diferente deve-se multiplicar o volume dos reagentes para 1 reação pelo número de reações necessárias.

3- Pipetar 15µL da solução de PCR final nos tubos ou poços determinados para as reações.

4- Adicionar 5µL do DNA extraído da amostra ou 5µL do Padrão Quantitativo ou 5µL de **Água (R6)**, usada como controle negativo.

5- Homogeneizar bem.

6- Observe que o volume total da reação é de 20µL, e cada corrida de PCR deve incluir os controles relevantes (Controle Negativo, Controle Positivo ou Padrões Quantitativos).

7- Homogeneizar bem.

8- Transporte os tubos/placa para o termociclador.

E. Definições do termociclador para a PCR em Tempo Real

Verificar o manual de operação do equipamento de PCR em tempo real para a programação do experimento.

1- Defina o tipo de experimento:

Teste Quantitativo com Curva Padrão ou Teste Qualitativo.

OBS: No caso do teste qualitativo, o Padrão A (R4) pode ser utilizado como Controle Positivo de amplificação.

2- Defina os detectores (sondas) fluorescentes como:

Alvo	Detector	Quencher
Ehrlichia	FAM	NFQ-MGB
Controle Interno	VIC	

OBS:

- Os Padrões Quantitativos não apresentam o Controle Interno (VIC), pois o mesmo é utilizado para o controle da extração e da amplificação das amostras.
- As amostras extraídas devem ser marcadas com os detectores FAM e VIC.

3- Defina os Padrões Quantitativos (Standards) como*:

Padrão A – 2×10^5 cópias/ μ L

Padrão B – 2×10^4 cópias/ μ L

Padrão C – 2×10^3 cópias/ μ L

Padrão D – 2×10^2 cópias/ μ L

**Programação utilizada no teste quantitativo*

4- Defina as condições dos ciclos:

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	95°C	3 minutos	1
2	95°C	15 segundos	45
	60°C	60 segundos	

Defina “Data Collection” como “stage 2, step 2 (60@0:60)”.

F. Validação do Resultado

1- Curva padrão

Curva padrão	Faixa permitida	Amplificação/Detecção
Coeficiente de correlação (R^2)	$0,99 \leq R^2 \leq 1,00$	Válida

Se o valor de R^2 não ficar entre os limites da faixa permitida, o resultado é considerado inválido e o teste deve ser repetido.

2- Amostras

Ehrlichia		Resultado	Detecção
FAM	VIC		
Presença de amplificação ou Concentração determinada	$25 \leq CT \leq 35$	Positivo	Válida
	$CT < 25$ ou $CT > 35$	Positivo	Inválido*
Ausência de amplificação ou Concentração indeterminada	$25 \leq CT \leq 35$	Negativo	Válida
	$CT < 25$ ou $CT > 35$	Negativo	Inválido*

***OBS:** Os valores de CT do Controle Interno variam de acordo com as condições do processo, como a eficiência da extração do DNA/RNA, a concentração das amostras e as configurações do termociclador. Logo, estas condições devem ser avaliadas quando os valores de CT não forem adequados e, se pertinente, os resultados podem ser validados.

Exemplo: Amostras com alto número de cópias de DNA/RNA podem, em alguns casos, inibir a amplificação do Controle Interno resultando em valor de CT fora da faixa ideal, este resultado não invalida o teste.

Se os requisitos acima não forem cumpridos, o ensaio é considerado inválido e o teste deve ser repetido.

G. Interpretação do resultado

O kit é capaz de detectar de 10 a 1.000.000 de cópias por reação.

O software do termociclador calcula automaticamente a concentração das amostras.

Exemplo: Se o programa mostrar uma concentração como 2.00E+005, então a concentração da amostra será 2.0×10^5 cópias/ μ L.

Resultado da Amostra em cópias/ μ L (FAM)	Cópias por reação
$\geq 1 \times 10^6$	> 1.000.000
$2 \leq \text{Quantidade} \leq 9 \times 10^5$	Quantidade obtida
< 2	< 10

A não detecção do DNA do patógeno não exclui a presença de infecção quando o título do patógeno estiver abaixo do limite de detecção deste kit.

Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional responsável.

Limitações do Processo

Contaminações cruzadas que ocorrem durante a coleta da amostra, processamento, transporte e armazenamento poderão ocasionar resultados falsos.

Sensibilidade Analítica

A técnica foi capaz de detectar aproximadamente 2 moléculas alvo em 5 μ L do produto de extração de DNA adicionado a reação de amplificação.

OBS: A sensibilidade analítica do produto pode sofrer interferência de fatores como a eficiência do kit/método utilizado para a extração dos ácidos nucleicos, e a sensibilidade do equipamento termociclador em tempo real usado.

Significado Clínico

O gênero *Ehrlichia* é composto por bactérias Gram-negativas intracelulares obrigatórias que infectam principalmente leucócitos. Dentre as espécies do gênero estão *E. ewingii*, *E. canis*, *E. muris*, *E. ruminantium* e mais recentemente foi adicionada a espécie *E. mineirensis*. É uma zoonose que infecta diversos animais selvagens e domésticos como cães, camundongos, ruminantes e até humanos. A transmissão ocorre através de vetores artrópodes como o carrapato. Em cães a doença é denominada Erliquiose monocítica canina, é uma doença de distribuição mundial, e pode ser classificada como aguda, subclínica ou crônica, tem como sinais clínicos característicos febre alta, depressão, letargia, anorexia, linfadenomegalia, esplenomegalia e hemorragias.

Logo, a detecção quantitativa do gênero *Ehrlichia* por PCR em tempo real, tem grande importância por ser um método sensível, preciso e ágil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
2. Baneth G, Harrus S, Ohnana FS, Schlesinger Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. *Vet Microbiol.* 2009;136(3-4):321-5.
3. Barrantes-González AV, Jiménez-Rocha AE, Romero-Zuñiga JJ, Dolz G. Serology, molecular detection and risk factors of *Ehrlichia canis* infection in dogs in Costa Rica. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7(6):1245-1251.
4. Ismail N, McBride JW. Tick-Borne Emerging Infections: Ehrlichiosis and Anaplasmosis. *Clin Lab Med.* 2017;37(2):317-340.2017;7;10(1):128.



QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 – Santa Branca
CEP 31565-130 – Belo Horizonte – MG – Brasil
Tel.: (31) 3439.5454
E-mail: sac@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 – Indústria Brasileira

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente
Tel.: 0800 0315454
E-mail: sac@bioclin.com.br

SIMBOLOGIA UNIVERSAL

	NÚMERO DE CATÁLOGO		FABRICADO POR
	NÚMERO DO LOTE		CONTROLE
	DATA DE FABRICAÇÃO		CONTROLE POSITIVO
	DATA DE VALIDADE (último dia do mês)		CONTROLE NEGATIVO
	LIMITE DE TEMPERATURA (conservar a)		RISCO BIOLÓGICO
	O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTE		INFLÂMVEL
	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CORROSIVO
	PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PROTEGER DA LUZ E CALOR		NÃO UTILIZAR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA
	NÃO REUTILIZE		PRODUTO ESTERELIZADO
	CUIDADO		PERIGO

BIO GEN VET

Bioclin · QUIBASA



Rua Teles de Menezes, 92 . Belo Horizonte . MG . Brasil . CEP: 31565-130

Tel +55 31 3439 5454 . www.bioclin.com.br

FARM. RESP. Silvio Wandalsen Arndt - CRF MG 7422

C.N.P.J.: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira