

PCRUN CANINE EHRLICHIA MOLEKÜLER TEŞHİS KİTİ

MEDICARE SAĞLIK HİZMETLERİ

Form area with multiple horizontal lines for text entry.

PCRUN CANINE EHRLICHIA MOLEKÜLER TEŞHİS KİTİ

ÜRÜN KODU: 50CEH108

I. KULLANIM AMACI

PCRun Canine Ehrlichia Moleküler Tespit Kiti, canine tam kanından ya da kemik iliğinden alınan DNA'da kopek Ehrlichia Canis'in tespit edilmesi için kullanılır. Bu kit akut enfeksiyonların tesbitinde kullanılır. Kit içinde testi kolayca ve doğru olarak gerçekleştirmek için gereken tüm bileşenleri içerir.

II. ÇALIŞMA PRENSİBİ

PCRun, 16s rDNA geninin kısmi şekilde izotermal amplifikasyonuna dayanan bir moleküler analizdir. Kitin amacı, Ehrlichia Canis'in kalitatif tespitidir. Kit, uyumlu ısı bloğu (Heat Block) ile çalışmak üzere tasarlanmıştır.

III. DEPOLAMA VE KULLANIM

- Depolama 2-25 C (oda sıcaklığı veya soğutucuda)
- Doğrudan güneş ışığından koruyun.
- Ambalaj etiketinde belirtilen son kullanma tarihinden sonra kullanmayınız.
- Dondurmayın!

Önlemler:

- PCRun testi numune üzerinde doğrudan kullanıma uygun değildir. Kiti kullanmadan önce uygun bir nükleik asit ekstraksiyon (çıkartım) metodu kullanılmalıdır.
- Reaksiyona giren DNA'nın kontamine olmasından kaçınmak için test yürütülürken laboratuvar muayene eldivenlerinin giyilmesi gerekir.
- PCRun™ Reaksiyon tüplerini mühürlenmiş paketlerinden yalnızca kullanmadan önce açın ve paketinden çıkarın.
- **Kullanılmamış PCRun reaksiyon tüplerini desikatörler (nem alıcı) birlikte orijinal alüminyum ambalajına geri koyun. Bant ile hava almayacak şekilde kapatın.**
- Ambalaj veya bileşenler zarar görmüşse kiti kullanmayın.

- Bu kitteki her bir bileşen yalnızca spesifik bir parti numarasıyla kullanıma uygundur. Bileşenlerin kalite kontrolü yapılmış ve standart parti numaraları olarak onaylanmıştır. Farklı parti numaralarına sahip bileşenleri karıştırmayın.
- Reaksiyon tüplerinin taşınması ve imhasında biyolojik ve moleküler atıklar için belirtilen kabul edilmiş arıtma prosedürlerini kullanın.

IV. ARKA PLAN

Ehrlichia, hematopoitik hücreler için tropizm gösteren, Gram negatif kosobasillez obligat bir hücreiçi bakteridir.

Köpek monositik ehrlichiosis (CME) öncelikle E.Canis kaynaklı olup temel kaynağı kene Rhipicephalus sanguineus'dur (1).

CME, ölümcül bir hastalık potansiyeline sahip olup doğru tedaviyi başlatmak için erken teşhise ihtiyaç duymaktadır.

Ehrlichiosis, 8 ila 20 gün inkübasyon periyodu ile karakterize edilir ve onu akut, sublinik ve bazı durumlarda kronik faz izler.

Trombositopeni, E.canis ile enfekte olan köpeklerin en yaygın ve tutarlı hematolojik anormalliği olarak düşünülür; ancak hastalık, depresyon, letarji, kilo kaybı, anoreksi, ateş, lenfadenomegali, splenomegali ve kanamalı diasez gibi çok çeşitli klinik bulguları gösterebilir .

Akut evrede trombositopeni, hafif anemi ve hafif lökopeni sublinik evrede hafif trombositopeni ve şiddetli kronik evrede pansitopeni görülür.

Hipoalbuminemi, hiperglobulinemi ve hipergaminoglobulinemi başlıca biyokimyasal anormalliklerdir (2).

Hafif klinik bulguları olan veya akut safhada olan köpekler, tedavi başladıktan 24-48 saat sonra klinik ve hematolojik parametrelerde dramatik bir düzelme gösterirken, kronik ehrlichiosis köpekler kötü bir prognoza sahiptir.

V. TANI

Tanı koymak için laboratuvar testlerinin ile birlikte klinik bulgular ve hasta geçmişi birlikte değerlendirilir.

Teşhis testleri, kan yaymalarının mikroskopik incelenmesi, indirekt floresan antikor (IFA), enzime bağlı immunosorbent tahlili, ELISA ImmunoComb ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler analizleri içerir.

Kan monositlerinde morfullerin varlığını mikroskopik yöntemle doğru olarak belirlemek için deneyim gereklidir.

Patojen bulguları geçicidir, ancak gözlemlenirse bir tanı doğrulanabilir.

Serum antikorları enfeksiyon başlangıcından en erken 7 gün sonra tespit edilmiştir, ancak bazı köpekler enfeksiyondan 28 gün sonrasına kadar seropozitifliğe sahip olmayabilir.

Hastalığın klinik bulguları genellikle serum antikorlarının gelişmesinden önce ve bazı vakalarda akut enfekte olmuş köpekler immünoşüpresif olduğunda (bağışıklıkları baskı altında) antikor test sonuçları negatif olabilir.

Serum titreleri, bir serum örneğinde bulunan antikor miktarını yansıtır; bununla birlikte, titreler her zaman enfeksiyon süresiyle veya hastalığın ciddiyetiyle ilişkili değildir. Ehrlichia'ya karşı yükseltilmiş antikorların, patojenlere maruz kalmanın güçlü bir göstergesi olduğuna dikkat edilmelidir.

PCRun moleküler analizi klinik hastalığı serokonversiyondan önce tespit edebilir.

American College of Veterinary Internal Medicine'nin moleküler analizin tedavi edilmemiş hayvanlarda ehrlichiosis'in başlangıç tanısı için seroloji ile birlikte kullanılması konusunda konsensüs oluşmuştur.

Buna ek olarak, PCR tedavi safhalarının izlenmesi ve antimikrobiyal terapi sonrası tedavinin izlenmesi için kullanılmalıdır. (3)

VI. KİT İÇERİĞİ

Bileşenler	İçerik	Miktar
Alüminyumpaket No. 03CEH100	8 adet tekli PCRun lyofilize reaksiyon tüpü	1
Tespit cihazı No. 03100010	Alüminyum pakette tek kullanımlık nükleik asit tespit kiti	10
Kapiller Tüpler	Tek kullanımlık plastik kapiller	1

No. 03200020	tüpler 20 µl*	
--------------	---------------	--

* Aerosol bariyer uçları olan yüksek doğrulukta laboratuvar pipetleri plastik pipetlerin yerine kullanılabilir

VII. KULLANICI TARAFINDAN SAĞLANACAK CİHAZLAR

- Biogal PCRun Numune Preparatı
- 0,2 PCR tüpleri ile uyumlu 60 C ısıyı sürdüren ısı bloğu (Isı bloğu Biogal tarafından tedarik edilebilir)
- Savaş
- Küçük makas
- İnce uçlu kalıcı kalem
- Koruyucu laboratuvar eldivenleri

VIII. NUMUNE ALIMI, DEPOLAMA VE TAŞIMA

Kit, PCRun Numune Preparat Kiti (Cat. No: 30PRE108) kullanılarak, 50 µl tam kandan ya da kemik iliğinden elde edilen nükleik asitin tespit edilmesi için uygundur. Kan örnekleri EDTA, heparin veya sodyum nitrat içine toplanabilir. Kan antikoagülanlarının PCR reaksiyonlarında önemli bir etkisi vardır, bu nedenle tüp üzerinde belirtildiği seviyede optimal hacimdeki kanın toplanması önemlidir.

En iyi sonucun elde edilmesi için, PCRun ile kullanılan numune ve hazırlanmış DNA ekstratlarının yeni alınmış/hazırlanmış olması tavsiye edilir.

Aksi belirtilmediği sürece, örnekler ve DNA ekstratları 24 saate kadar 2-8 C'de veya daha uzun süreler için -20 C'de tutulabilir.

IX. PROTOKOL - PCRun™ REAKSİYONU

- I. Analiz için çalışma alanını temizleyin. Çalışma alanı, 1:10 oranında su ile seyreltilmiş (%3,5) çamaşır suyu ile temizlenmelidir.
- II. Analizle alakalı tüm kısımları hazırlayın:
 - Elde edilen DNA örneği
 - Reaksiyon tüplerini içeren paket
 - 20 µl hacminde kapiller tüpler
 - İnce uçlu kalıcı kalem
- III. Isı bloğunu açın ve 60 C'ye ayarlayın. Blok istenen sıcaklığa ulaştığında reaksiyonu başlatın.

- IV. PCRun şeridini koruyucu ambalajdan çıkarın. Ortamın kuru kalmasını sağlamak için kullanılmamış tüpleri alüminyum zarfa koymayı veya bantla sıkıca kapatmaya dikkat edin. Sekiz tekli reaksiyon tüpü boşluk sağlayan ince bir plastik parça ile tutturulmuştur. Küçük ve temiz bir makas kullanmak, kapakları zedelemekten istenen sayıda tüpü ayırmanızı sağlar. Tüpleri nazikçe zemine vurun ve küçük beyaz taneciklerin tüpün dibinde olup olmadığına bakın.
- V. Tüp kapaklarını numuneleri tanımlamak için anlaşılır şekilde etiketleyin.
- VI. Reaksiyon tüplerinin kapaklarını tek tek dikkatlice açın. 20 µl tek kullanımlık kapiler tüp kullanarak, reaksiyon tüpüne PCRun™ Numune Preparat kiti ile ekstrat edilmiş 20 µl ölçüğünde DNA uygulayın. Kapiler tüpteki içeriğin tamamının PCRun™ reaksiyon tüpüne boşalttığınızdan emin olun. Tüpü, içindeki sıvının dibe çökmesi için zemine hafifçe vurun. Taneciklerin çözülmesini sağlamak için karışımı 1 dakikalığına oda sıcaklığında inkübe edin.
- VII. Reaksiyon tüpünü, önceden ısıtılmış bloktaki (60° C) uygun deliğe yerleştirin ve tam olarak 1 saatliğine inkübe edin. Tüpün kapağını inkübasyon sırasında veya sonra açmayın.
- VIII. Inkübasyon süresinin sonunda (1 saat) tüpü ısıtma bloğundan çıkarın ve tek kullanımlık nükleik asit tespit cihazı ile hemen analiz edin.

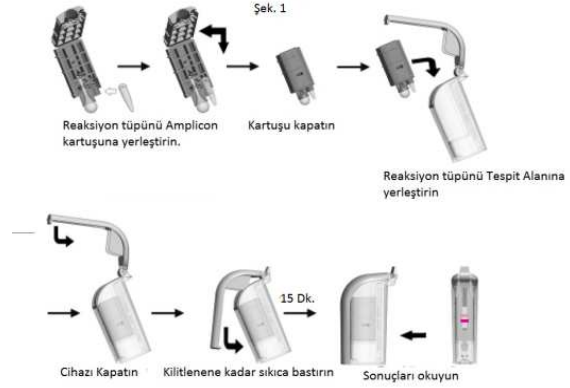
X. PCRun™ REAKSİYONUNUN TEK KULLANIMLIK NÜKLEİK ASİT TESPİTİ CİHAZI İLE ANALİZİ

Her test için bir adet tek kullanımlık nükleik asit tespit cihazı gerekir. Tespit cihazını açın tüm bileşenleri çıkarın. Cihaz iki plastik parçadan oluşur; plastik tampon ampulü içeren Amplicon Kartuşu ve yanıl akış şeridi içeren Tespit Boşluğu (Şek. 1).

- I. Ampulün içinde sıvı olduğundan emin olun.
- II. Her boşluğu numune ID' si ile işaretleyin.
- III. PCRun™ reaksiyon tüpünün kapak bölümünü, tampon ampulünün yanındaki geniş alan ile hizalayın. Reaksiyon tüpünü Amplicon Kartuşa tutturmak için hafifçe baskı uygulayın (Şek. 1).
- IV. Amplicon Kartuşu ikiye katlayın ve kapatın. Kartuşu Tespit Boşluğuna yerleştirin. Yerleştirirken ampulün aşağı doğru baktığından

ve boşluğun kolundan uzak bir şekilde yerleştirdiğinden emin olun.

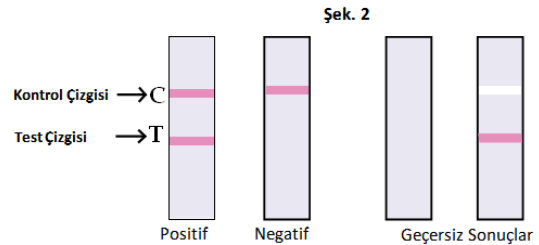
- V. Cihazı kilitlemek için kolu aşağı doğru itin.
- VI. Sonuçları görmek için 15-30 dk. bekleyin. 30 dakikayı geçirdikten sonra alınan sonuçlar geçersizdir.



XI. SONUÇLARIN OKUNMASI VE YORUMLANMASI

Geçerli test durumunda kırmızı kontrol şeridi ortaya çıkmalıdır. Hem negatif hem de pozitif sonuçlarda kontrol çizgisi görünmelidir. (Şek. 2):

- I. **Pozitif Sonuç** – Üstteki kontrol çizgisi ve alttaki test çizgisi olmak üzere iki çizgi belirir. Kontrol çizgisi ve test çizgisinin görünmesi köpek veya kedi Parvovirüsünün var olduğunu belirtir.
- II. **Negatif Sonuç** – Tek kontrol çizgisi görünür. Yalnızca kontrol çizgisinin görünmesi, DNA' da köpek veya kedi Parvovirüsünün bulunmadığını veya kopya sayısının tespit limitinin altında olduğunu gösterir.



XII. KISITLAMALAR

Yeni aşılanmış hayvanlar pozitif PCR sonuçlarına sahip olabileceği için pozitif kan PCR' ı tek başına parvoviral enfeksiyon tanısı için yeterli değildir. Tanılama, hasta geçmişi, klinik belirtiler, laboratuvar parametreleri ve

PCR testi sonuçlarının kombinasyonlarına göre yapılmalıdır.

XIII. ANALİTİK HASSASİYET

PCRun, saf DNA'daki hedef genin 10^2 kopyasını tespit edebilir.

XIV. REFERANSLAR

- 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

Daha fazla bilgi ve yardım almak için lütfen Türkiye distribütörü (MediCare) veya Biogal Galed Labs ile iletişime geçiniz.

BIOGAL Galed Labs

E-posta: info@biogal.co.il

Telefon: + 972-4-9898605

Faks: + 972-4-9898690

MediCare Sağlık Hizmetleri

E-posta: info@medicareint.com

Telefon: + 90 (533) 433 8214

Telefon: + 90 (216) 330 8489

**Biogal's
ImmunoComb**

mediCare
MediCare Sağlık Hizmetleri