



***Ehrlichia* sp - *Anaplasma* sp Kit qPCR by Mascolab®**

Descripción: Kit de uso rápido y sensible para la detección de ADN de *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp. Mediante PCR en tiempo real sonda de hidrólisis. Contiene todos los componentes necesarios requeridos para cada reacción.

Componentes: Master Mix Ehrl-Ana¹ Listo para uso
Control Negativo (H₂O libre de RNasas y DNasas).
Control Positivo dúplex (Plásmidos).
Diluciones para realización de curvas estándar.
Mix control interno (CI) para evaluación de inhibición (Gen mitocondrial de Canino-HEX y Ribosomal de Felino-FAM).

¹Contiene Taq pol de arranque en caliente, DNTPs, Potenciador de PCR, enzima UNG, Primers Forward y Reverse, Sondas específicas, PCR buffer, Cofactor MgCl₂, H₂O Tipo I.

Condiciones de almacenamiento: Se recomienda mantener a -20°C para garantizar la efectividad de la preparación a largo plazo. Los componentes del kit toleran condiciones de envío y almacenamiento a 4°C por un mes.

Especificidad:

***Ehrlichia* (FAM).** En conjunto los primers y sonda están diseñados para detectar *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* y especies reportadas en bases de datos de secuencias de ADN pertenecientes al género *Ehrlichia*.

***Anaplasma* (HEX).** En conjunto los primers y sonda están diseñados para detectar *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma marginali*, *Anaplasma ovis* y especies reportadas en bases de datos de secuencias de ADN pertenecientes al género *Anaplasma*.

Instrucciones de uso

Montaje

Detección de Ehrlichia-Anaplasma

1. Descongele el Master Mix Ehrl-Ana¹ a temperatura ambiente, homogenice mediante agitador vórtex vigorosamente por 15 segundos y centrifugue inmediatamente antes de su uso.
2. Agregue 17uL del Master Mix Ehrl - Ana¹ a cada vial de reacción y 3uL de material genético extraído de cada muestra problema ($\leq 150\text{ng/uL}$), para un volumen total de 20 microlitros.
3. Emplee 3 microlitros de Control Negativo en una reacción diferente, e igualmente 3 microlitros de Control Positivo en otro vial.
4. Asegúrese de tapar correctamente los viales de PCR y centrifugue.
5. Ubique los viales en estricto orden de montaje en el termociclador.

Prueba de inhibición

1. Descongele el mix CI a temperatura ambiente, homogenice mediante agitador vórtex vigorosamente por 15 segundos y centrifugue inmediatamente antes de su uso.
2. Agregue 17uL del mix CI listo para su uso a cada vial de reacción y 3uL de material genético extraído de cada muestra a la que desee evaluar integridad e inhibición ($< 500\text{ng}$), para un volumen total de 20 microlitros.
3. Asegúrese de tapar correctamente los viales de PCR y centrifugue.
4. Ubique los viales en estricto orden de montaje en el termociclador.

Condiciones de amplificación

Se recomienda configurar los parámetros antes de realizar el montaje experimental. Generar una plantilla con las características de la tabla 1 o 2 le ayudara a no

mantener un tiempo excesivo sus reacciones a temperatura ambiente antes ubicarlas en el termociclador.

Recuerde siempre configurar la adquisición de fluorescencia en la etapa de extensión.

Tabla 1. Configuración de etapas de qPCR para el *Ehrlichia* spp - *Anaplasma* spp Kit qPCR by Mascolab®.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
<i>Desnaturalización Inicial</i>	1	95	2 minutos
<i>Desnaturalización</i>	40-45	95	15 segundos
<i>Anillaje/Extensión</i>	40-45	60	60 segundos

Tabla 2. Configuración rápida de qPCR para el *Ehrlichia* spp - *Anaplasma* spp Kit qPCR by Mascolab®.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
<i>Desnaturalización Inicial</i>	1	95	2 minutos
<i>Desnaturalización</i>	40-45	95	10 segundos
<i>Anillaje/Extensión</i>	40-45	60	30 segundos

Curvas estándar

La curva estándar se podrá realizar en base al montaje de las diluciones cuyas concentraciones se ilustran en la tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones de mezcla dúplex de plásmidos de *Ehrlichia* y *Anaplasma*.

Vial	Copias/uL <i>Ehrlichia</i> / <i>Anaplasma</i>
1	4448000/3888000
2	889600/777600
3	35584/31104
4	1423,36/1244,16
5	284,672/248,832
6	11,38688/9,95328

Cada plásmido contiene la secuencia target de un solo patógeno, la cual se amplifica mediante primers y sondas específicas de cada uno. No se proporciona el genoma completo de los patógenos. Se recomienda montaje por triplicado o duplicado de las diluciones para una mejor adquisición de datos.

Resultados

Detección de *Ehrlichia* sp (FAM)



Imagen 1. Curvas de amplificación esperadas canal green (FAM).

Detección de *Anaplasma sp* (HEX)



Imagen 2. Curvas de amplificación esperadas canal yellow (HEX).

La interpretación debe realizarse a criterio del investigador en base al umbral establecido, acorde al termociclador empleado además de otras variables dentro del protocolo experimental (Tabla 4).

Las imágenes son solamente ilustrativas ya que cada software y equipo producirá curvas diferentes dependiendo del tipo de normalización de la fluorescencia. Las muestras sometidas al mix de control interno deberán obtener una curva de amplificación en el canal Yellow para muestras de origen canino y una curva por el canal Yellow y/o Green para las muestras de origen felino.

Tabla 4. Guía para la interpretación de resultados

Muestra	Control Positivo	Control Negativo	Control Interno	Resultado
-	+	-	+	Prueba exitosa, muestra negativa
+	+	-	+	Prueba exitosa, muestra positiva
-/+	-	-	-	Prueba fallida, se requiere repetición
-/+	+	+	+	Prueba fallida, se requiere repetición

Se deben obtener amplificaciones sigmoidales en el control positivo y muestras para ser consideradas positivas (Imagen 1 e Imagen 2). Adicionalmente, se recomienda realizar un montaje confirmatorio para muestras cuyos Ct/Cq sean ≥ 35 , debido a probabilidades de Ct alto obtenidos por contaminación.

Equipamiento adicional requerido

Kit de extracción de ácidos nucleicos de alto rendimiento para evitar contaminantes e inhibidores en la qPCR.

Termociclador de tiempo real con capacidad de detección FAM y HEX.

Micropipetas.

Microcentrífugas.

Viales de PCR.

Otros instrumentos e insumos de laboratorio.

Documentación:

Toda la documentación referente a validación y otros parámetros de ensayo se encuentra disponible en: https://drive.google.com/drive/folders/1_Tn_Z3PApUZx5eNKl-fcNqfGnyR_6c81?usp=sharing

Precauciones:

Se recomienda dispensar los mixes y controles positivos en alícuotas.

Descongelar los mixes a temperatura ambiente y luego pasarlo a un bloque térmico entre 4-8°C mientras realiza el montaje, luego guardarlos a -20°C.

Evitar exponer a luz directa durante los procedimientos de montaje evitará la degradación de las sondas.

El control negativo debe permanecer bajo el umbral como parte del background de fluorescencia. Se recomiendan buenas prácticas de laboratorio para evitar contaminaciones y falsos positivos.

Kit de detección para uso en investigación únicamente. No destinado para diagnóstico.