



# PCRrun™

## Kit para Detecção Molecular de Leishmaniose Canina

Somente para uso em diagnóstico veterinário *in vitro*

### FINALIDADE

O kit PCRrun® para Detecção Molecular de Leishmaniose Canina Kit tem a função de detectar a presença de DNA de *Leishmania infantum* isolado de **sangue total** e medula óssea de cães. O Kit contém todos os componentes requeridos para uma execução rápida e fácil do procedimento.

### PRINCÍPIO

O PCRrun® é um ensaio molecular baseado na amplificação de uma parte do DNA de cinetoplasto (kDNA) associado com *L. infantum*. É usado para detecção qualitativa de *L. infantum*. Esse kit foi desenvolvido para ser usado juntamente com o PCRrun® Reader.

### ESTOCAGEM E ARMAZENAMENTO

- Conservar entre 2-25 °C (temperatura ambiente ou refrigerado).
- Evitar exposição à luz solar.
- Não utilizar após a validade informada no rótulo.
- Não congelar ou deixar em local que ocorra extremos de temperatura.

#### Precauções:

- O ensaio PCRrun® não foi desenvolvido para amostras frescas. Uma adequada extração de DNA deve ser anteriormente executada para uso no presente kit.
- Para evitar a contaminação de DNA na reação, deve-se sempre utilizar luvas descartáveis durante a realização do teste.
- Abrir e remover os tubos de reação PCRrun® das embalagens seladas de alumínio somente no momento de sua utilização.
- **Retornar os tubos de reação PCRrun® não utilizados para o pacote de alumínio original, juntamente com objeto secante. Selar com fita adesiva.**
- Não utilize o kit se os componentes estiverem danificados.
- Cada componente neste kit é adequado para uso apenas com um número do lote específico. Os componentes foram homologados no controle da qualidade como unidade de lote padrão. Não misturar componentes de diferentes lotes.
- Utilizar procedimentos sanitários do Brasil, destinados a resíduos biológicos e moleculares, no manuseio e descarte de componentes do kit.

### INFORMAÇÕES

A leishmaniose é uma importante doença resultante da infecção por protozoários pertencentes à família *Trypanosomatidae*. *Leishmania* spp. São usualmente transmitidas entre hospedeiros por mosquitos que agem como vetores. Os mamíferos podem estar infectados sem apresentar sinais clínicos por longos períodos, e podem tornar-se cronicamente infectados mesmo após cura clínica. Animais com infecção subclínica podem transmitir as

*Leishmanias* por meio de vetores bem como por transfusões de sangue e transmissão transplacentária.

A espécie *L. infantum* é classificada como doença visceral em humanos, porém, cães possuem quanto manifestação visceral como cutânea. Os canídeos têm sido relatados como os principais hospedeiros reservatórios de *L. infantum*, e o cão é a espécie mais importante responsável pela manutenção do parasita no ciclo doméstico. O período de incubação de *L. infantum* em cães varia de três meses a sete anos como já relatado. Em alguns pacientes, sinais clínicos severos ocorrem logo após o início da infecção enquanto outros permanecem assintomáticos. Esses animais podem apresentar sintomas a qualquer momento, particularmente se estiverem imunossuprimidos.

### DIAGNÓSTICO

A leishmaniose pode se manifestar como infecção subclínica, doença autolimitada ou doença não autolimitada severa. Os principais achados clínicos são lesões de pele. Há também outros sinais como letargia, anorexia, perda de peso, anemia, esplenomegalia e linfadenopatia local ou generalizada. Doença renal crônica resultando em óbito é comum em infecções por *L. infantum*. Poliartrite erosiva ou não-erosiva com polimiosite pode levar à atrofia muscular progressiva<sup>3</sup>.

A infecção pode ser diagnosticada por observação microscópica direta de amastigotas em macrófagos presentes no sangue, granulomas oculares, tecidos coletados de linfonodos, medula óssea e raspados de pele, porém os parasitas são às vezes dificilmente detectados. Testes sorológicos estão disponíveis como a imunofluorescência indireta, ensaio imuno-enzimático (ELISA) e outros testes de aglutinação. Muitos cães assintomáticos são sorologicamente positivos, porém nem todos esses pacientes ou aqueles com lesões de pele possuem anticorpos detectáveis. A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem demonstrado maior sensibilidade que técnicas convencionais de microscopia e cultura usados separadamente ou em conjunto<sup>1,2</sup>. O PCRrun® é um método sensível para a detecção do agente.

### CONTEÚDO DO KIT

Componente	Conteúdo	Quantidade
Envelope de alumínio	8 tubos contendo enzimas e outros componentes liofilizados	2
Tampão PCRrun®	Tampão PCRrun® para dissolver os pellets liofilizados	2 frascos, 200 µL
PCRrun® Controle positivo	DNA de <i>Leshmania</i> liofilizado	1 frasco

#### EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS:

- Pipetas com barreira para aerossol;
- Água ultra pura;
- Kit de extração de DNA compatível com kit PCRrun®;
- PCRrun® Reader fornecido pela Biogal;
- Cronômetro;
- Tesoura;
- Marcador permanente de ponta fina;
- Luvas de proteção.

## COLHEITA DE AMOSTRA E ARMAZENAMENTO

Esse kit é usado para detectar ácidos nucleicos extraídos de sangue total ou medula óssea por kits de extração de DNA desenvolvidos para uso em reações de PCR. As amostras de sangue podem ser coletadas em EDTA, heparina ou citrato de sódio. Anticoagulantes possuem uma substancial consequência em reações de PCR e por essa razão, é necessário que o volume de sangue seja corretamente coletado de acordo com as instruções contidas no tubo.

Para melhores resultados, amostras recém-adquiridas e DNA recém-extraído são recomendados para as reações com o kit PCRRun®. Amostras e DNA extraído podem ser mantidos a 2-8°C por até 24 horas ou -20°C por um período de tempo maior.

## PROTOCOLO - REAÇÃO PCRRun®

1. Limpar a área de trabalho para o ensaio. A área de trabalho deve ser descontaminada com solução de hipoclorito a 3,5%, diluído com água numa proporção de 1:10.
2. Material para o ensaio:
  - ✓ DNA extraído;
  - ✓ Embalagem com tubos de reação;
  - ✓ Tampão PCRRun®;
  - ✓ Pipeta de 5 µL;
  - ✓ Pipeta de 15 µL;
  - ✓ Controlo Positivo PCRRun®;
  - ✓ Marcador permanente de ponta fina;
  - ✓ PCRRun® Reader (Utilizar o manual de instruções PCRRun® Reader para executar o procedimento).

### 3. Controle Positivo

Um controle positivo é fornecido com o kit. É recomendado que esse controle seja preparado ao mesmo tempo da preparação das amostras a serem testadas..

A concentração final da solução será de 10<sup>5</sup> cópias/5µL.

- a. Adicione 500 µL de água de grau molecular (água ultra pura, própria para reações de biologia molecular) ao frasco contendo o *pellet* liofilizado. Agite em vórtex e deixe repousar por 5 minutos em temperatura ambiente. Agite em vórtex novamente. O frasco contém 10<sup>6</sup> cópias do gene alvo/5µL. Rotule o frasco. Esta é a solução de estoque.
- b. Prepare um tubo contendo 45µL de água de grau molecular (água ultra pura).
- c. Adicione 5µL da solução de estoque (preparada no item "a") nesse tubo resultando em uma concentração final de 10<sup>5</sup> cópias/5µL e agite em vórtex. Essa diluição será empregada como controle positivo.
- d. Use 5µL do controle positivo para as reações PCRRun da mesma forma como é realizado com DNA de amostras a serem testadas. O restante da solução de estoque dele ser distribuído em pequenos volumes e mantido a -20°C para serem usados posteriormente.

**O controle positivo pode ser uma fonte de contaminação. Por isso pede-se o máximo de atenção e cuidado para que o mesmo não tenha contato com outros componentes do kit. O controle positivo deve ser adicionado ao tubo de reação e seguir com as demais complementações realizadas para amostras a serem testadas.**

4. Ligue o PCRRun® Reader e siga as instruções do manual do equipamento.
5. Remova os tubos PCRRun® da embalagem de alumínio. Tenha cuidado para retornar os tubos que não foram usados para o envelope selando-o para manter um ambiente seco. Oito tubos de

reação estão conectados por uma pequena tira de plástico. Com uma pequena tesoura, desconecte o número de tubos desejados sem prejudicar as tampas. Bata o tubo verticalmente e suavemente sobre uma superfície plana e firme para que todo o conteúdo desça ao fundo do tubo. A pequena pastilha branca deve estar localizada na parte inferior do tubo.

6. Identificar os tubos com o número de cada amostra.
7. Cuidadosamente, adicione 15 µL do tampão PCRRun® no tubo de reação (fazer um por vez). Fechar a tampa e incubar a mistura à temperatura ambiente por 1 minuto para permitir que o pellet se dissolva completamente.
8. Adicionar 5 µL da amostra de DNA dentro do tubo PCRRun® e misture rigorosamente. Fechar a tampa do tubo firmemente e bater suavemente o tubo em uma superfície para trazer todo o fluido para o fundo do tubo.
9. Coloque o tubo de reação no PCRRun® Reader pré aquecido e siga as instruções do manual do equipamento.

## ANÁLISE DA REAÇÃO PCRRun®

Após aproximadamente 1 hora de incubação, os resultados de cada reação irão aparecer na tela do equipamento. Siga as instruções encontradas no manual que acompanha o PCRRun® Reader.

## LIMITAÇÕES

Como qualquer teste de diagnóstico, resultados obtidos com o Kit de Detecção Molecular PCRRun® devem ser interpretados juntamente com achados clínicos e outros procedimentos laboratoriais. Amostras de animais submetidos a tratamento com antibióticos podem obter resultado negativo na reação de PCR.

## SENSIBILIDADE

A reação PCRRun® pode detectar um mínimo de 10<sup>2</sup> cópias do gene alvo em DNA purificado

## REFERÊNCIAS

1. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. Esther Bensoussan,<sup>1</sup> Abdelmajeed Nasereddin,<sup>1</sup> Flory Jonas,<sup>2</sup> Lionel F. Schnur,<sup>1</sup> and Charles L. Jaffe<sup>1</sup>- J. Clin Microbiol, Apr. 2006, p. 1435–1439
2. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. O F Osman, L Oskam, E E Zijlstra, N C Kroon, G J Schoone, E TKhalil, A M El-Hassan and P A Kage - J. Clin. Microbiol. 1997, 35(10):2454
3. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. Carla Maia, João Ramada, José M. Cristóvão, Luzia Gonçalves, Lenea Campino - The Veterinary Journal, Volume 179, Issue 1, January 2009, Pages 142-144



**Manufacturer:** Biogal Galed Labs. Acs. Ltd.  
TEL: +972 (0)4 9898605 FAX: +972 (0)4 9898690  
email: info@biogal.co.il www.biogal.co.il  
Kibbutz Galed, 1924000 - Israel