



PCRRun®

Kit de detecção molecular da Leishmaniose canina

Apenas para uso veterinário e diagnóstico *in vitro*

N.º decat.30CLI108

Manual do usuário

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O Kit de Detecção Molecular de Leishmania Canina PCRRun® destina-se à detecção de DNA da *Leishmania infantum*, isolado de **swabs conjuntivais, aspirações com agulha fina de gânglios linfáticos, medula óssea e sangue**, utilizando **kit de extração de DNA N°30PRE208**.

O kit deve ser utilizado durante uma infecção ativa. Contém todos os componentes descartáveis necessários para realizar um teste fácil e preciso.

PRINCÍPIO

O PCRRun® é um ensaio molecular baseado na amplificação isotérmica de parte do DNA cinetoplastídeo associado ao *L. infantum*. Destina-se à detecção qualitativa da *Leishmania infantum*. Este kit foi concebido para ser utilizado com um bloco térmico compatível.

ARMAZENAMENTO E MANUSEIO

- Armazenamento 2-25 °C (temperatura ambiente ou refrigerado).
- Evite a exposição à luz solar direta.
- Não utilize após a data de validade indicada no rótulo da embalagem.
- Não congelar!

Precauções:

- O ensaio PCRRun® não deve ser utilizado diretamente na amostra. Deve ser realizado um método adequado de extração de ácido nucleico antes de usar este kit.
- Para evitar a introdução de DNA contaminante na reação, devem-se usar luvas de exame de laboratório limpas durante a realização do teste.
- Abra e remova os tubos de reação PCRRun® das embalagens apenas antes da utilização.
- **Retorne os tubos de reação PCRRun® não utilizados à embalagem de alumínio, juntamente com o dessecador, e feche bem o fecho zip-lock.**
- Não utilize o kit se a embalagem ou os componentes estiverem danificados.
- Cada componente deste kit é adequado para uso apenas com o número de lote específico. Os componentes foram aprovados no controle da qualidade como uma unidade de lote padrão. Não misture componentes de números de lotes diferentes.
- Empregue procedimentos sanitários, designados para resíduos biológicos e moleculares, ao manusear e descartar os tubos de reação.

CONTEXTO

A leishmaniose é uma importante doença transmitida por vetores, resultante de uma infecção protozoária causada por parasitas classificados na família *Trypanosomatidae*. *Leishmania* spp. é geralmente transmitida indiretamente entre hospedeiros por flebotomíneos, que atuam como vetores biológicos. Os mamíferos podem ser infectados de forma assintomática por longos períodos e, muitas vezes, permanecem cronicamente infectados mesmo após a cura clínica. Animais infectados subclínicamente podem transmitir *Leishmania* aos flebotomíneos e os parasitas também podem ser transmitidos por transfusões de sangue e transmissão transplacentária.

O *L. infantum* é frequentemente classificado como uma doença visceral em humanos, porém os cães geralmente apresentam envolvimento visceral e cutâneo. Os canídeos são considerados os principais hospedeiros reservatórios do *L. infantum*, e os cães são a espécie mais importante na manutenção desse parasita em ciclos domésticos. O período de incubação relatado para o *L. infantum* em cães varia de três meses a sete anos.

Em alguns cães, sinais clínicos graves ocorrem logo após o animal ser infectado, enquanto outros cães permanecem assintomáticos, em alguns casos por toda a vida. Esses animais podem apresentar sinais clínicos a qualquer momento, principalmente se ficarem imunossuprimidos. A doença geralmente é de progressão lenta.

DIAGNÓSTICO

A leishmaniose pode se manifestar como uma infecção subclínica, doença autolimitada ou doença grave clássica não autolimitada. Os principais achados clínicos associados à leishmaniose canina típica são lesões cutâneas. Sintomas variáveis, como letargia, anorexia, perda de peso, anemia, esplenomegalia e linfadenopatia local ou geral, podem acompanhar essa infecção. A doença renal crônica, com resultado em morte, é comum em infecções por *L. infantum*. A poliartrite erosiva ou não erosiva com polimiosite pode levar à atrofia muscular progressiva.

A leishmaniose pode ser diagnosticada por observação microscópica direta de amastogotos em macrófagos corados presentes no sangue, granulomas oculares, tecido coletado de linfonodos e aspirados da medula óssea, bem como raspagem da pele das lesões. Às vezes, os parasitas são indetectáveis por esse método devido ao baixo número. *Leishmania* spp. pode ser cultivada em uma variedade de meios, no entanto, a cultura *in vitro* requer 5 a 30 dias antes que o diagnóstico possa ser determinado. Os testes sorológicos estão disponíveis na forma de Teste de Anticorpos Fluorescentes Indiretos (IFAT), Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e vários métodos de aglutinação. A maioria dos cães infectados sintomaticamente são soropositivos, porém nem todos os animais infectados assintomaticamente ou aqueles com lesões cutâneas localizadas apresentam títulos de anticorpos detectáveis. A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem se mostrado mais sensível do que as técnicas convencionais de microscopia e cultura usadas isoladamente ou em combinação 1,2). O PCRRun® é um método sensível para detectar *Leishmania*.

CONTEÚDO DO KIT

Componentes	Quantidade
PCRun® tira de 8 tubos de reação individuais com Leishmania liofilizada	1
Tampão PCRun® para redissolver pellets de reação liofilizados	1 frasco, 200 µl
Embalagem de alumínio com dispositivo descartável para detecção de ácido nucleico.	8
Pipetas capilares de plástico descartáveis - 5 µl*	10
Pipetas capilares de plástico descartáveis - 15 µl*	10

*Pipetas de laboratório precisam com pontas com barreira contra aerossóis podem ser usadas no lugar das pipetas de plástico.

EQUIPAMENTO A SER FORNECIDO PELO USUÁRIO:

- Recomenda-se o kit de preparação de amostras PCRun para extração de DNA (nº de cat. 30PRE208) 8 amostras;
- Bloco térmico que mantém 60 °C – compatível com tubos PCR de 0,2. O bloco térmico é comercializado pela Biogal;
- Temporizador;
- Tesoura pequena;
- Marcador permanente de ponta fina;
- Luvas de proteção para laboratório;

COLETA, ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DE AMOSTRAS

O kit é adequado para detectar ácido nucleico *extraído de swabs conjuntivais, aspirações com agulha fina (FNA), medula óssea e sangue utilizando o kit de extração Nº 30PRE208.*

Para obter resultados ótimos, recomenda-se a utilização de amostras recentemente colhidas e extratos de DNA recém-preparados com o kit extrator PCRun®.

A menos que seja recomendado de outra forma, as amostras e os extratos de DNA podem ser mantidos a 2-8 °C por até 24 horas ou a -20 °C por um período prolongado.

PROTOCOLO - REAÇÃO PCRun®

1. Prepare uma área de trabalho limpa para o ensaio. A área de trabalho deve ser descontaminada com alvejante doméstico comercial (3,5%) diluído em água na proporção de 1:10.

2. Prepare todas as partes do ensaio:

✓ **Amostra de DNA extraído com o Extrator de DNA**

✓ Embalagem com tubos de reação

✓ Pipetas capilares para dispensar volumes de 5 µl e 15 µl

✓ Marcador permanente de ponta fina

3. Ligue o bloco térmico e ajuste para 60 °C. Quando o bloco atingir a temperatura desejada, continue com a reação.

4. Retire os tubos de reação PCRun da sua embalagem. Tenha o cuidado de repor os tubos não utilizados ao envelope de alumínio e feche-o completamente com o fecho zip para manter um ambiente seco. Oito tubos de reação individuais estão ligados por um espaçador de plástico fino. Utilizando uma tesoura pequena e limpa, separe a quantidade necessária de tubos sem abrir as tampas. Bata levemente os tubos numa superfície e observe se o pequeno pellet branco se encontra no fundo do tubo.

5. Identifique claramente a tampa dos tubos para identificação da amostra.

6. Abra cuidadosamente a tampa dos tubos de reação, um de cada vez. Utilizando a pipeta capilar descartável de 15 µl, pipete 15 µl, de tampão PCRun® no tubo de reação. Certifique-se de que todo o conteúdo da pipeta capilar foi esvaziado no tubo de reação PCRun®. Bata o tubo em uma superfície para levar todo o líquido para o fundo do tubo. Incube a mistura à temperatura ambiente por 1 minuto para permitir que o sedimento se dissolva completamente. Usando o pipeta capilar de 5 µl, dispense 5µl de DNA extraído no mesmo tubo. Misture batendo levemente no tubo. Certifique-se de que todo o líquido esteja no fundo do tubo de reação.

7. Coloque o tubo de reação no orifício apropriado do bloco pré-aquecido (60 °C) e incube por exatamente 1 hora. Não abra a tampa do tubo durante ou no final do período de incubação.

8. No final do período de incubação (1 hora), remova o tubo do bloco de aquecimento e analise imediatamente com o dispositivo descartável de detecção de ácido nucleico.

É necessário um dispositivo descartável de detecção de ácido nucleico para cada teste. Abra e remova os componentes do dispositivo de detecção. O dispositivo é composto por duas peças de plástico: o cartucho de amplicon, que contém um bulbo de tampão de plástico, e a câmara de detecção, que contém a tira de fluxo lateral (Figura 1).

1. Verifique se o bulbo contém tampão.
2. Marque cada câmara com a identificação da amostra.
3. Fixar a seção da tampa do tubo de reação PCRun® no espaço localizado ao lado do bulbo com tampão. Aplique uma leve pressão para fixar o tubo de reação ao Cartucho Amplicon (Figura 1).
4. Feche o Cartucho Amplicon dobrando ao meio. Coloque o cartucho na Câmara de Detecção com o bulbo e tubo voltados para baixo e o bulbo para frente.
5. Empurre a alavanca para baixo para travar o dispositivo.
6. Aguarde 15 minutos para ler os resultados. Os resultados lidos após 30 minutos são inválidos.



Fig. 1

LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Um teste válido deve apresentar uma banda de controle vermelha. A linha de controle deve aparecer independentemente de um resultado positivo ou negativo. (Figura 2):

1. **Resultado positivo** - aparecem duas bandas, a linha de controle superior e a linha de teste inferior. O aparecimento da linha de controle e da linha de teste indica a presença de DNA de *Leishmania infantum*.
2. **Resultado negativo** - aparece uma única linha de controle. O aparecimento apenas da linha de controle indica a ausência do DNA de *Leishmania infantum* ou que o número de cópias está abaixo do limite de detecção.

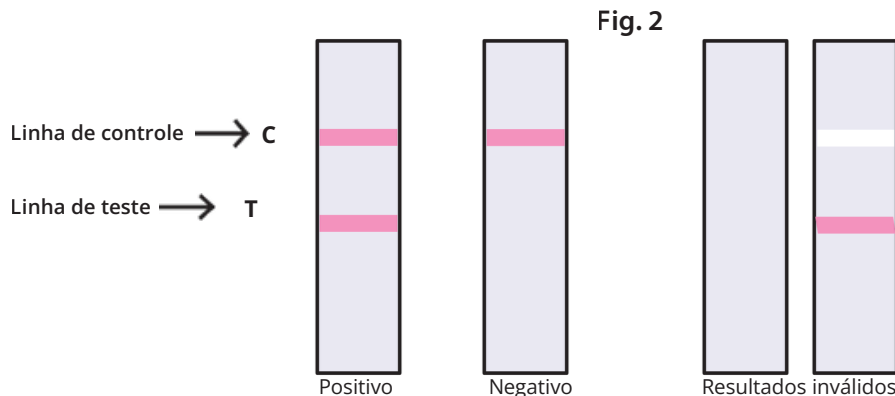


Fig. 2

LIMITAÇÕES

Como em qualquer kit de diagnóstico, os resultados obtidos devem ser usados como complemento a outros achados clínicos e laboratoriais. A precisão dos resultados do teste depende da qualidade da amostra e da adesão ao protocolo. Um resultado negativo pode ser obtido se a amostra for inadequada ou se a concentração do patógeno alvo estiver abaixo da sensibilidade do teste. Animais em tratamento provavelmente apresentarão um resultado negativo na PCR.

SENSIBILIDADE ANALÍTICA

A reação PCRun® pode detectar 10 cópias do gene alvo em DNA puro.

REFERÊNCIAS

1. Comparação de ensaios PCR para diagnóstico de leishmaniose cutânea. Esther Bensoussan, 1 Abdelmajeed Nasereddin, 1 Flory Jonas, 2 Lionel F. Schnur, 1 e Charles L. Jaffe 1- J. Clin Microbiol, abril de 2006, p. 1435-1439
2. Avaliação da PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral. O F Osman, L Oskam, E E Zijlstra, N C Kroon, G J Schoone, E TKhalil, A M El-Hassan e P A Kage - J. Clin. Microbiol. 1997, 35(10):2454
3. Diagnóstico da leishmaniose canina: técnicas convencionais e moleculares utilizando diferentes tecidos. Carla Maia, João Ramada, José M. Cristóvão, Luzia Gonçalves, Lenea Campino - The Veterinary Journal, Volume 179, Edição 1, janeiro de 2009, Páginas 142-144