



# *Leishmania infantum* PCR

## *Instruções de uso*

---

**REF** VET105

Revisão: Janeiro/2026

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 .....	4
Amostras .....	6
Procedimento .....	6
A. Extração do DNA .....	6
B . Preparo dos Reagentes .....	6
C . Diluição dos Padrões Quantitativos .....	7
D . Preparo da PCR .....	7
E . Definições do termociclador para a PCR em Tempo Real .....	8
F . Validação do Resultado .....	9
G . Interpretação do resultado .....	10
Limitações do Processo .....	11
Sensibilidade Analítica .....	11
Significado Clínico .....	11
Referências Bibliográficas .....	12
Atendimento ao Consumidor .....	12
Simbologia Universal .....	13

## FINALIDADE

Teste para detecção quantitativa do DNA de *Leishmania infantum* em amostras biológicas através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Produto desenvolvido para diagnóstico molecular veterinário *in vitro*. O uso deve ser restrito a profissionais qualificados e conforme as legislações e normas técnicas aplicáveis.

## PRINCÍPIO DE AÇÃO

O kit **Bio Gene Vet *Leishmania infantum* PCR** é um ensaio *in vitro* baseado na detecção quantitativa do DNA de *L. infantum* 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/ $\mu$ L, utilizando a curva padrão gerada a partir do padrão quantitativo contido no kit.

## APRESENTAÇÃO

Reagente	Apresentação	
	Bio Gene Vet <i>Leishmania infantum</i> PCR	
	50 Testes	100 Testes
<b>R1</b>	1 x 55 $\mu$ L	1 x 110 $\mu$ L
<b>R2</b>	1 x 500 $\mu$ L	1 x 1,0 mL
<b>R3</b>	1 x 55 $\mu$ L	1 x 110 $\mu$ L
<b>R4</b>	1 x 250 $\mu$ L	1 x 500 $\mu$ L
<b>R5</b>	1 x 750 $\mu$ L	1 x 1,5 mL
<b>R6</b>	1 x 750 $\mu$ L	1 x 1,5 mL
<b>R7</b>	1 x 250 $\mu$ L	1 x 500 $\mu$ L

## REAGENTES

- R1. Solução PCR:** Primer, Sonda, TRIS-HCl.
- R2. Mix Taq:** Polimerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Estabilizantes.
- R3. Solução PCR Cl:** Primer, Sonda, TRIS-HCl.
- R4. Padrão A (2 x 10<sup>5</sup> cópias/μL):** Plasmídeo, TRIS-HCl, EDTA.
- R5. Diluente:** TRIS-HCl, EDTA.
- R6. Água:** Água livre de DNase/RNase.
- R7. Controle Interno:** Plasmídeo, TRIS-HCl, EDTA.

## EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

### Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no quadro anterior.
- Instruções 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 nucleicos;

## CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento e transporte é de -20°C (-10 a -30°C). Evite realizar mais de cinco ciclos de congelamento e descongelamento dos reagentes. Caso seja necessária uma utilização mais frequente, recomenda-se a aliquotagem dos reagentes para preservar sua estabilidade e desempenho. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

## CUIDADOS ESPECIAIS

- 1- Produto desenvolvido para diagnóstico molecular veterinário *in vitro*. O uso deve ser restrito a profissionais qualificados e conforme as legislações e normas técnicas 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. Evitar 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 reações.
- 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- Evite realizar mais de cinco ciclos de congelamento e descongelamento dos reagentes. Caso seja necessária uma utilização mais frequente, recomenda-se a alíquotagem dos reagentes para preservar sua estabilidade e desempenho.
- 8- Armazenar as amostras de DNA a -20°C, caso não sejam 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 FDS (Ficha com Dados de Segurança) disponibilizadas no site [www.bioclin.com.br](http://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 total (EDTA), punção de medula óssea, punção de linfonodos e tecido (pele).

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 refrigeradas (2°C a 8°C) por até 5 dias ou a -20°C para longos períodos.<sup>1</sup>

Utilizar amostras de DNA com pureza e concentração adequadas para amplificação por PCR. 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 (R7)** deve ser adicionado às amostras durante a extração, conforme descrito abaixo:

1- Adicionar 5 µL do **Controle Interno (R7)** 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 (R7)** diretamente à amostra biológica pura, pois pode resultar em degradação do mesmo.

### B. Preparo dos reagentes

Os reagentes **R4** e **R7** contêm molde de DNA. Eles devem ser manipulados em área apropriada para evitar a contaminação dos demais reagentes.

1- Centrifugar (pulso spin) os reagentes **Solução PCR (R1)**, **Solução PCR CI (R3)**, **Padrão A (R4)** e **Controle Interno (R7)** antes da abertura dos microtubos.

2- O Mix Taq (R2) não contém fluoróforo de referência passiva (ROX).

### C. Diluição dos Padrões Quantitativos\*

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

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

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

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

5- Trocar a ponteira e pipetar 10 µL 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 –  $2 \times 10^5$  cópias/µL

Padrão B –  $2 \times 10^4$  cópias/µL

Padrão C –  $2 \times 10^3$  cópias/µL

Padrão D –  $2 \times 10^2$  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/ Teste	25 Reações/ Testes	50 Reações/ Testes	100 Reações/ Testes
Mix Taq (R2)	10 µL	250 µL	500 µL	1 mL
Solução PCR (R1)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Solução PCR Cl (R3)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Água (R6)	3 µL	75 µL	150 µL	300 µL

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 15 µL da solução de PCR final nos tubos ou poços determinados para as reações.
- 4- Adicionar 5 µL do DNA extraído da amostra ou 5 µL do Padrão Quantitativo ou 5 µL de **Água (R6)**, usada como controle negativo.
- 5- Homogeneizar bem.
- 6- Observe que o volume total da reação é de 20 µL, e cada corrida de PCR deve incluir os controles relevantes (Controle Negativo e 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
<i>Leishmania infantum</i>	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 –  $2 \times 10^5$  cópias/ $\mu$ L

 Padrão B –  $2 \times 10^4$  cópias/ $\mu$ L

 Padrão C –  $2 \times 10^3$  cópias/ $\mu$ L

 Padrão D –  $2 \times 10^2$  cópias/ $\mu$ L

*\*Programação utilizada no teste quantitativo*
**4- Defina as condições dos ciclos:**

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Ciclos</b>
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°C - 60)".

**F. Validação do Resultado**
**1- Curva padrão**

<b>Curva padrão</b>	<b>Faixa permitida</b>	<b>Amplificação/Deteção</b>
Coefficiente 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

<i>L. infantum</i>		Resultado	Detecção
FAM	VIC		
Presença de amplificação ou Concentração determinada	CT ≤ 35	Positivo	Válida
	CT > 35	Positivo	Inválido*
Ausência de amplificação ou Concentração indeterminada	CT ≤ 35	Negativo	Válida
	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 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  $2.0 \times 10^5$  cópias/ $\mu$ L.

Resultado da Amostra em cópias/ $\mu$ 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 médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente. Os resultados obtidos devem ser avaliados considerando os dados clínicos e os exames laboratoriais do paciente.

### 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 1  $\mu$ L do produto de extração de DNA adicionado à 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

A *Leishmania infantum* é o agente causal da leishmaniose visceral em cães e humanos, uma enfermidade de evolução crônica que pode manifestar-se por perda de peso progressiva, anemia, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Transmitida pela picada de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, essa forma de leishmaniose apresenta alta morbidade e, se não tratada adequadamente, elevada taxa de mortalidade. A detecção e quantificação de *L. infantum* por PCR em tempo real (qPCR) destacam-se por oferecer sensibilidade e especificidade superiores às dos métodos convencionais, permitindo tanto a identificação de infecções clínicas quanto subclínicas, bem como o monitoramento preciso da evolução

da infecção e da resposta terapêutica. Além disso, o resultado rápido em poucas horas possibilita intervenções clínicas mais ágeis e fundamentadas. Dessa forma, o kit de qPCR para *Leishmania infantum* torna-se ferramenta essencial tanto para o diagnóstico laboratorial de referência quanto para o acompanhamento longitudinal de animais de companhia sob tratamento, contribuindo significativamente para a gestão clínica e controle da doença.

## 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. Bretagne S, Durand R, et al. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. Clin Diagn Lab Immunol. 2001;8(4):828-31.
3. Ferreira SdA, Almeida GG, et al. Nasal, Oral and Ear Swabs for Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis: New Practical Approaches for Detection of *Leishmania infantum* DNA. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7(4):e2150. (2013)
4. Galluzzi L, Ceccarelli M, et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. Parasit Vectors. 2018 May 2;11(1):273. 2004;42:1409-13.



### 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 031 5454  
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		INFLÂMABEL
	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



**Bioclin · QUIBASA**

 Rua Teles de Menezes, 92 . Belo Horizonte . MG . Brasil . CEP: 31565-130  
Tel +55 31 3439 5454 . [www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br)  
FARM. RESP. Silvio Wandalsen Arndt - CRF MG 7422  
C.N.P.J.: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira