

PCRUN CANINE LEISHMANIA MOLEKÜLER TEŞHİS KİTİ

ÜRÜN KODU: 30CLI108/50CLI108

I. KULLANIM AMACI

PCRun Canine Leishmania Moleküler Tespit Kiti, köpek tam kanından ya da kemik iliğinden alınan DNA'da Leishmania infantum'un tespit edilmesi için kullanılır. Kit içinde testi kolayca ve doğru olarak gerçekleştirmek için gereken tüm bileşenleri içerir.

II. ÇALIŞMA PRENSİBİ

PCRun, kinetoplastid DNA geninin kısmi şekilde izotermal amplifikasyonuna dayanan bir moleküler analizdir. Kitin amacı, Leishmania infantum'un 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

Leishmaniasis, Trypanosomatidae ailesinde sınıflandırılan parazitlerin neden olduğu protozoanın enfeksiyonundan kaynaklı önemli bir vektör kaynaklı hastalıktır. Leishmania spp. genellikle biyolojik vektörler gibi davranan kum sinekleri tarafından dolaylı olarak konakçılar arasında iletilir. Memeliler, uzun süreli asemptomatik olarak enfekte olabilirler ve klinik tedaviden sonra da genellikle kronik olarak enfekte kalırlar. Subklinik olarak enfekte olmuş hayvanlar Leishmania'yı kum sinekleri ile ve aynı zamanda kan nakli ve transplasental yolla bulaştırabilirler.

L. infantum insanlarda genellikle viseral bir hastalık olarak sınıflandırılır, ancak köpeklerin genelde viseral ve kutanöz tutulumu vardır. Canidaeelerin L.infantum için ana bulaşma kaynağı olduğu bildirilmiştir ve köpekler, bu parazitin yaşam döngülerinin korunmasında rol oynayan en önemli türdür. Köpeklerde L. infantum için bildirilen kuluçka süresi üç aydan yedi yıla değişir.

Bazı köpeklerde hayvanın enfekte olmasından kısa süre sonra şiddetli klinik bulgular ortaya çıkarken ; diğer bazı köpeklerde hastalık asemptomatik kalır, bazı vakalarda aseptomatik hal ömür boyu kalır. Bu hayvanlarda, özellikle bağışıklıkları bastırıldıklarında, herhangi bir zamanda belirtiler görülebilir. Hastalık genellikle yavaş ilerlerler.

V. TANI

Leishmaniasis, subklinik bir enfeksiyon, kendini sınırlayan hastalık veya kendini sınırlamayan klasik şiddetli hastalık olarak ortaya çıkabilir.

Tipik olarak köpeklerde leishmaniasis ile ilişkili ana klinik bulgular cilt lezyonlarıdır. Uyuşukluk, iştahsızlık, ağırlık kaybı gibi değişken semptomlar, anemi, splenomegali ve lokal veya genel lenfadenopati bu tip

bir enfeksiyona eşlik edebilir. Ölümle sonuçlanan kronik böbrek hastalığı L. infantum enfeksiyonları ile ortaktır. Polimiyozitli eroziv veya non-eroziv poliartrit, ilerleyici kas atrofisine yol açabilir.

Leishmaniasis, kanda boyanmış makrofajlarda amastogotların direkt mikroskopik olarak gözlenmesi ile, oküler granülomlar, lenf nodundan toplanan doku ve kemik iliği aspiratlarının yanı sıra lezyonlardan yapılan cilt kazısı ile tespit edilebilir. Ancak bazen parazitlerin örnekte düşük sayılarda olmasından dolayı bu yöntemle teşhis saptanamamaktadır. Leishmania spp. Çeşitli ortamlarda kültür yapılabilir, ancak in vitro kültürde teşhis için 5-30 gün gereklidir. Serolojik olarak Dolaylı Floresan Antikor Testi (IFAT), Enzim Bağlı İmmunosorbent Testi (ELISA) ve çeşitli aglütinasyon yöntemleri mevcuttur. Semptomatik olarak enfekte olmuş köpeklerin çoğu seropozitifdir, ancak asemptomatik olarak enfekte olmuş hayvanlar ya da lokalize cilt lezyonları olan hayvanlarda tespit edilebilir antikor titreleri bulunmamaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ın tek başına veya kombinasyon halinde kullanılan klasik mikroskopi ve kültür tekniklerine göre daha fazla hassas olduğu gösterilmiştir. PCRun™, Leishmania'yı tespit etmek için hassas bir yöntemdir.

KİT İÇERİĞİ

Bileşenler	İçerik	Miktar
Alüminyumpaket No. 03CLI100I	8 adet tekli L. eishmania PCRun lyofilize reaksiyon tüpü	1
Tespit cihazı No. 03100010	Alüminyum pakette tek kullanımlık nükleik asit tespit kiti	10
Kapiller Tüpler No. 03200020	Tek kullanımlık plastik kapiler tüpler 20 µl*	1

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

VI. 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

VII. 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.

VIII. 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 kapiler 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

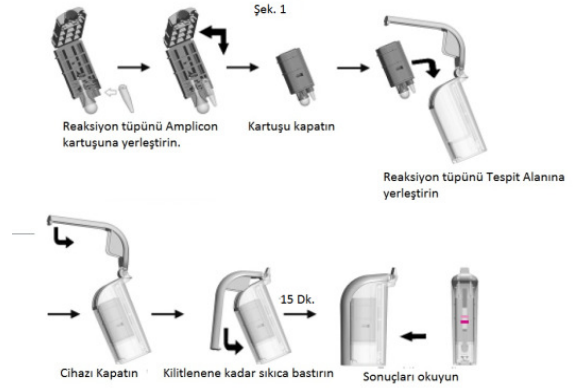
kullanarak, reaksiyon tüpüne PCRun™ Numune Preparat kiti ile ektrat edilmiş 20 µl ölçüğünde DNA uygulayın. Kapiler tüpteki içeriğin tamamının PCRun™ reaksiyon tüpüne boşalttığınızdan emin olun. Tüpü, içindeki sıvının dibe çökmesi için zemine hafifçe vurun. Taneciğin çözülmesini sağlamak için karışımı 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.

IX. 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).

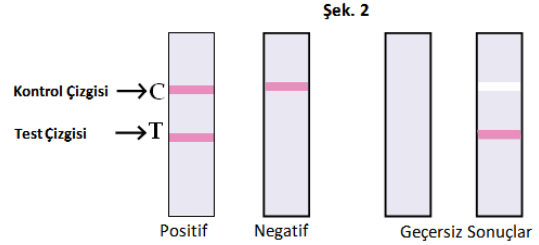
- I. Ampulün içinde sıvı olduğundan emin olun.
- II. Her boşluğu numune ID' si ile işaretleyin.
- III. PCRun™ reaksiyon tüpünün kapak bölümünü, tampon ampulünün yanındaki geniş alan ile hizalayın. Reaksiyon tüpünü Amplicon Kartuşa tutturmak için hafifçe baskı uygulayın (Şek. 1).
- IV. Amplicon Kartuşu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



X. 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.



XI. 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.

XII. ANALİTİK HASSASİYET

PCRun, saf DNA' daki hedef genin 10² kopyasını tespit edebilir.

XIII. REFERANSLAR

1. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. Esther Bensoussan,¹ Abdelmajeed Nasereddin,¹ Flory Jonas,² Lionel F. Schnur,¹ and Charles L. Jaffe¹- 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, Joao Ramada, Jose M. Cristovao, Luzia Goncalves, Lenea Campino - The Veterinary Journal, Volume 179, Issue 1, January 2009, Pages 142-144

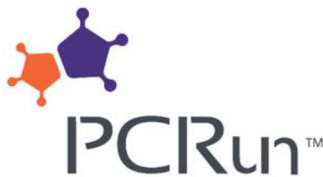
Daha fazla bilgi ve yardım almak için lütfen Türkiye distribütörü (MediCare) veya Biogal Galed Labs ile iletişime geçiniz.

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

