



PCRRun™

Kit para Detecção Molecular de Leptospira Patogênica em Cães

Somente para uso em diagnóstico veterinário *in vitro*

FINALIDADE

O Kit para Detecção Molecular de Leptospira Patogênica em Cães PCRRun® é desenvolvido para a detecção de DNA de *Leptospira* isolado de sangue total, medula óssea e urina concentrada. O kit contém todos os componentes requeridos para executar o teste de forma rápida e simples.

PRINCÍPIO

O PCRRun® é um teste molecular baseado na amplificação de parte do gene *Hapl*. É usado para detecção qualitativa de espécies patogênicas de Leptospiras. 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 leptospirose é uma zoonose causada por espécies patogênicas do gênero *Leptospira*. Os sorovares mais comumente encontrados em cães incluem o *icterohaemorrhagiae*, *canicola*, *pomona*, *bratislava*, *grippotyphosa* and *autumnalis*⁽¹⁾.

As leptospiras, transmitidas pelo contato direto com fontes contaminadas, podem penetrar na pele ou mucosas e difundir-se dentro do hospedeiro. Em cães, as espiroquetas podem ser

encontradas na corrente sanguínea nos primeiros 7-10 dias após a exposição. A fase septicêmica é seguida por uma fase imune, que se caracteriza pelo aparecimento de anticorpos e a saída das leptospiras da corrente sanguínea. As espiroquetas vão localizar-se nos túbulos renais dos hospedeiros cronicamente infectados. A leptospirose começa aproximadamente na segunda semana após o início dos sintomas. Hospedeiros de manutenção, tais como cães, permanecem clinicamente assintomáticos liberam leptospiras para o ambiente através da urina.

DIAGNÓSTICO

A suspeita de leptospirose ocorre com base em sinais clínicos e resultados das funções renais e hepáticas. Um diagnóstico conclusivo é geralmente realizado demonstrando a presença de bactérias nas amostras ou por encontrar níveis crescentes de anticorpos ao longo do tempo. Técnicas disponíveis incluem histoquímica, cultura, reações antígeno/anticorpos e molecular por hibridização ou amplificação. Isolamento de organismos, de amostras clínicas, leva várias semanas, a análise microscópica é altamente subjetiva e os anticorpos são detectáveis no sangue a partir de 5-7 dias após o início dos sintomas. Inquéritos sorológicos relatam que, mais de 20% dos soros caninos analisados, contêm anticorpos específicos para sorovares de *Leptospira* patogênica, no entanto, é difícil correlacionar títulos sorológicos com a prevalência de infecções crônicas⁽²⁾.

A amplificação molecular é utilizada para a rápida detecção de agentes patogênicos envolvidos em infecções agudas. Os protocolos podem ser aplicados, para amplificar seletivamente as sequências de DNA altamente conservadas, que estão presentes em leptospiras patogênicas, mas ausente em espécies saprófitas. A amplificação molecular de DNA isolado a partir de amostras clínicas pode fornecer rapidamente o diagnóstico na fase precoce da doença antes mesmo dos títulos de anticorpos estarem em níveis detectáveis. As amostras de urina podem ser utilizadas para identificar portadores crônicos da doença⁽²⁾.

KIT CONTENTS

Componentes	Conteúdo	Quantidade
Embalagem de alumínio	8 tubos com enzimas e outros componentes liofilizados	2
Frasco	1X PBS 1.5 mL	1
Frasco	10X PBS 1.5 mL	1
Tampão PCRRun	Tampão PCRRun® para dissolver o liofilizado do tubo	2 tubos, 200 µL
PCRRun® Controle Positivo	PCRRun® <i>Leptospira</i> liofilizada	1 tubo

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
- Para amostras de urina: centrífuga que alcance 10.000 x g

COLHEITA DE AMOSTRA E ARMAZENAMENTO

O Kit é apropriado para detectar ácido nucleico extraído de sangue total ou pellet derivado da concentração de 1 mL de urina usando o PCRRun® Sample Prep Kit.

Amostras de Sangue

Sangue total pode ser colhido 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 colhido de acordo com as instruções contidas no tubo.

Urina

Duas gotas (100 µL) de 10X PBS (fornecido) devem ser adicionadas a 1 mL de urina. A amostra deve ser então centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante é descartado e o material sólido (pellet) encontrado no fundo do tubo deve ser resuspenso em uma gota (50 µL) de 1X PBS (fornecido) antes da extração do DNA. As amostras de urina concentradas podem ser congeladas.

Para melhores resultados, amostras recém-adquiridas e DNA recém-extraído são recomendados para as reações com o kit PCRRun®. Recomenda-se processar as amostras logo após a colheita. Amostras de sangue e pellets de urina devem ser mantidos congelados a -20°C se não processados imediatamente. O transporte de amostras deve ser feito em condições de baixa temperatura.

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;
- ✓ Controle 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 10⁵ 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 10⁶ 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 10⁵ 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 10² cópias do gene alvo em DNA purificado.

REFERÊNCIAS

1. Levett, P. N. 2001. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 14:296–326.

2. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. Infect. Immun. 68 (4), 2276–2285, 2000.



Fabricante: 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