



PCRRun™

Kit para Detecção Molecular de DNA de *Leptospira* em cães

Somente para uso Veterinário e *In vitro*

SKU30CLP104

Instruções de uso

FINALIDADE

O kit contém todos os componentes requeridos para executar o teste de forma rápida e simples.

PRINCÍPIO

O Kit de Detecção Molecular de *Leptospira* Canina PCRRun® destina-se à detecção de *Leptospira interrogans* em DNA **isolado de sangue e urina** usando um kit de extração de DNA nº30PRE104. O kit deve ser empregado durante uma infecção ativa e contém todos os componentes descartáveis necessários para realizar um teste fácil e preciso.

ESTOCAGEM E MANUSEIO

- Conservar entre 2-25 °C (temperatura ambiente ou refrigerado).
- Evitar exposição direta de luz solar.
- Não utilizar após a validade informada no rótulo.
- Não congelar.
- Não submeter a altas temperaturas

Precauções:

- Para evitar contaminação de DNA na reação, sempre utilizar luvas descartáveis durante a realização do teste.
- Abrir e remover os tubos de reação PCRRun das embalagens seladas de alumínio, somente imediatamente antes da sua utilização.
- Retornar os tubos de reação PCRRun não utilizados para a embalagem de alumínio original, juntamente com o dessecante. Sellar com fita adesiva.**
- Não utilize o kit se a embalagem ou os componentes estiverem danificados. Cada componente neste kit é adequado para uso apenas de lote específico. Os componentes foram homologados no controle da qualidade como unidade de lote padrão. Não misturar componentes de diferentes números de lote.
- Utilizar procedimentos sanitários do Brasil, destinados a resíduos biológicos e moleculares, no manuseio e descarte de componentes do kit.
- Realizar a extração de DNA em uma área separada da área utilizada para a reação PCRRun

INFORMAÇÕES

A leptospirose é uma doença zoonótica bacteriana causada por espécies patogênicas do gênero *Leptospira*. Os sorovares patogênicos típicos que infectam cães incluem icterohaemorrhagiae, canicola, pomona, bratislava, grippityphosa e autumnalis¹. As leptospirosas, transmitidas pelo contato direto com fontes contaminadas, podem penetrar na pele descamada ou nas membranas mucosas e se disseminar dentro do hospedeiro. Nos caninos, as espiroquetas móveis podem ser encontradas na corrente sanguínea nos primeiros 7 a 10 dias após a exposição. A fase septicêmica é seguida por uma fase imune que se caracteriza pelo aparecimento de anticorpos e pela eliminação das leptospirosas da corrente sanguínea. As espiroquetas então colonizam os túbulos renais de hospedeiros cronicamente infectados. A leptospiúria começa aproximadamente na segunda semana após o início dos sinais clínicos. Hospedeiros de manutenção, como cães, geralmente permanecem clinicamente assintomáticos e liberam leptospirosas no ambiente através da urina.

DIAGNÓSTICO

A leptospirose pode ser suspeitada com base em sinais clínicos e resultados das funções renal e hepática. Um diagnóstico conclusivo geralmente é feito demonstrando a presença da bactéria nas amostras ou encontrando níveis crescentes de anticorpos IgG ao longo do tempo.

As técnicas disponíveis incluem histoquímica, cultura, reações antígeno/anticorpo e hibridização ou amplificação de base molecular. O isolamento da cultura de organismos causadores de amostras clínicas leva várias semanas, a análise microscópica é altamente subjetiva e os anticorpos IgM são detectáveis no sangue apenas 5-7 dias após o início dos sintomas. Inquéritos serológicos relatam que mais de 20% dos soros caninos examinados contêm anticorpos específicos para sorovares patogênicos de *Leptospira*, no entanto, é difícil correlacionar os títulos sorológicos com a prevalência de infecções crônicas². A amplificação molecular é empregada para a detecção rápida de patógenos envolvidos em infecções agudas. Os protocolos podem ser aplicados para amplificar seletivamente sequências de DNA altamente conservadas que estão presentes em leptospirosas patogênicas, mas ausentes em espécies saprófitas. A amplificação molecular do DNA isolado de amostras clínicas pode confirmar rapidamente o diagnóstico na fase inicial da doença, antes que os títulos de anticorpos estejam em níveis detectáveis e as amostras de urina possam ser usadas para identificar portadores crônicos da doença² e confirmar a infecção com altos títulos de IgG

CONTEÚDO DO KIT

Conteúdo	Quantidade
Tiras com 4 tubos com reagentes liofilizados	1
1X PBS 1.5 mL	1
10X PBS 1.5 mL	1
Embalagem de alumínio com detector de ácido nucleico	4
Pipetas capilares plásticas - 20 µL*	5
Pipetas descartáveis*	5
Pipetas capilares de plástico - 50 µL*	5

* Pipetas calibradas e ponteiras com barreira para aerossol podem ser usada no lugar das pipetas de plástico.

EQUIPAMENTOS E SOLUÇÕES NECESSÁRIOS:

- Biogal PCRRun® Extrator de DNA da Amostra
- Bloco de aquecimento a 60 °C compatível com tubos de 0,2 mL para PCR.
- Bloco de aquecimento (é comercializado pela Biogal)
- Temporizador
- Caneta marcadora permanente de ponta fina
- Luvas descartáveis

COLETA, ESTOCAGEM E TRANSPORTE

O kit é adequado para detectar ácido nucleico extraído de 50 µl de sangue total ou do sedimento resultante da concentração de 2 mL de urina usando o Kit de Preparação de Amostras PCRRun® (Cat No.30PRE104).

Amostras de sangue

O sangue total deve ser coletado de preferência com EDTA. Os anticoagulantes sanguíneos têm uma consequência substancial no PCR portanto, é imperativo que o volume ideal de sangue seja coletado conforme indicado no tubo. **Sedimento de urina** Aproximadamente 2,0 mL de urina devem ser coletados. Usando a pipeta (ver instruções na próxima página) adiciona-se 10X PBS à amostra na proporção de 1:10 (100 µL para cada 1 mL de urina) imediatamente após a coleta. A amostra deve então ser centrifugada em alta velocidade (10.000 x g) por dez minutos. O sobrenadante é descartado e o material sólido (*pellet*) encontrado na parte inferior do tubo de ensaio é ressuspensionado. Usando a pipeta de plástico de 50 µL, adicione 50 µL de PBS 1X para ressuspender o *pellet*. As amostras de urina concentradas devem ser armazenadas congeladas se não forem usadas imediatamente para extração de DNA. Para obter melhores resultados, amostras adquiridas recentemente e extratos de DNA recém-preparados são recomendados para uso com o Kit PCRRun®. Recomenda-se processar as amostras perto do momento da coleta. Amostras de sangue e *pellets* de urina devem ser mantidos congelados a -20°C se não forem processados imediatamente. O transporte de amostras deve ser sempre feito em condições frias.

PROTOCOLO - REAÇÃO PCRun®

1. Limpe a área de trabalho para o ensaio com solução de hipoclorito a 3,5%, diluído com água numa proporção de 1:10.

2. Material para o ensaio:

- DNA extraído da amostra com o extrator de DNA n°30PRE104
- Embalagem com os tubos de reação;
- Pipetas capilares para 20 µL de volume;
- Marcador de ponta fina;

3. Ligue o bloco de aquecimento e ajustar a 60°C. Assim que o bloco atingir a temperatura, prossiga.

4. Retire e destaque os tubos necessários para a reação PCRun® da embalagem. Quatro tubos individuais estão ligados por um espaçador de plástico fino. Utilizando uma tesoura pequena e limpa, destacar o número necessário de tubos sem abrir as tampas. Tomar cuidado para retornar os tubos não utilizados para o envelope de alumínio e selar completamente com fita adesiva para manter um ambiente seco. 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.

5. Identifique os tubos com o número de cada amostra.

6. Abra cuidadosamente a tampa dos tubos de reação, um de cada vez. Com a pipeta capilar descartável de 20 µL, pipete 20 µL do DNA extraído com o Kit de Extração de DNA PCRun® e transfira-o para o tubo de reação. Confira se todo o conteúdo da pipeta capilar foi transferido corretamente ao tubo. Bata suavemente o tubo de reação em uma superfície rígida para trazer todo o fluido para o fundo do mesmo. Incube o tubo em temperatura ambiente por 1 minuto para permitir que o *pellet* se dissolva completamente.

7. Coloque o tubo de reação no orifício apropriado no bloco de aquecimento pré-aquecido (60 °C) e incube durante 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 imediatamente analise com o dispositivo de detecção de ácido nucleico.

REAÇÃO COM O DISPOSITIVO DE DETECÇÃO de DNA

É necessário um dispositivo de detecção de ácido nucleico descartável para cada amostra. Abrir e remover os componentes do dispositivo de detecção. O dispositivo é composto por duas peças de plástico, contendo no cartucho *amplicon* um bulbo com tampão e a câmara de detecção, contendo a tira de fluxo lateral (Fig. 1).

1. Verifique se o bulbo contém o tampão.

2. Identifique cada dispositivo com o número da amostra.

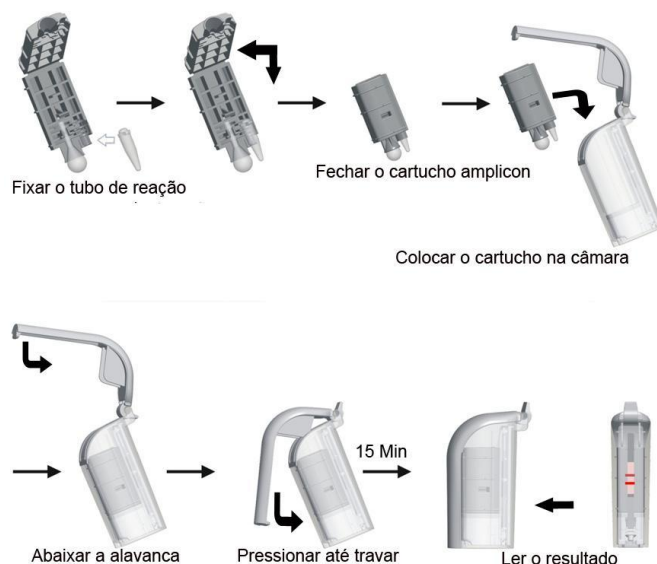
3. Fixe a seção da tampa do tubo de reação no espaço localizado ao lado do bulbo com tampão. Aplique uma leve pressão para prender o tubo de reação no cartucho *amplicon* (Fig. 1).

4. Feche bem o cartucho *amplicon*. Colocar o cartucho na câmara de detecção com o bulbo virado para baixo e para frente do dispositivo.

5. Empurre a alavanca para baixo para travar o dispositivo.

6. Leia os resultados em 15 minutos. Resultados lidos depois de 30 minutos são inválidos.

FIG. 1



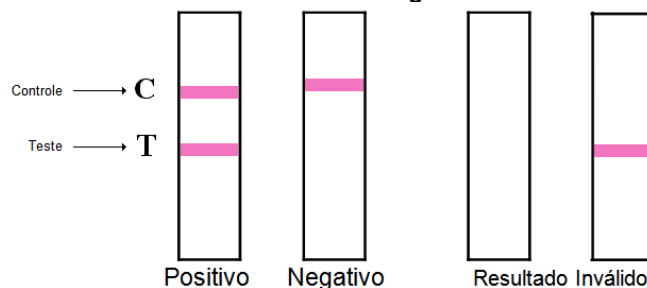
LEITURA E INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO

Para que o resultado seja válido, devem-se observar os seguintes requisitos (Fig. 2):

1. Resultado Positivo - Duas bandas aparecem, a linha de controle superior e a linha de ensaio inferior. O surgimento de ambas as linhas (a de controle e a linha do teste) indica a presença do DNA de *Leptospira interrogans*.

2. Resultado Negativo - Uma única linha de controle aparece. A linha de controle deve aparecer independentemente de um resultado positivo ou negativo. O teste será inválido se a linha de controle não estiver presente. O aparecimento somente da linha controle indica apenas a ausência do DNA de *Leptospira interrogans* ou que o número de cópias está abaixo do limite de detecção.

Fig. 2



LIMITAÇÕES

Como acontece com qualquer teste de diagnóstico, o resultado do PCRun® deve ser interpretado tendo em conta todos os dados clínicos e laboratoriais.

SENSIBILIDADE

Este teste pode detectar 10³ cópias do gene alvo no 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 (2000) The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. Infect Immun 68(4):2276–2285



Importador e Distribuidor Exclusivo:

JMR Trading Ltda/VP Diagnóstico. CNPJ: 11.857.347/0001-71
 Registro no MAPA: PR 000017-5
 Rua Mandaguari, 1752, Pinhais, PR, Brasil, CEP: 83.325-015
 Resp Téc.: Margareth Carvalho S. Agottani (CRMV-PR 3288)
 SAC: info@vpdiagnostico.com.br / www.vpdiagnostico.com.br
 PRODUTO PARA USO VETERINÁRIO – NÃO NECESSITA DE REGISTRO



Fabricante:

Biogal Galed Labs
 Kibbutz Galed, 1924000
 Tel: +972-4-9898605
 www.biogal.com