

**CONJUNTO DE PRIMERS E SONDAS PARA DETECÇÃO DE LEPTOSPIRA SPP (FAM) - RUO**  
**LEPTOSPP-20**  
**Instruções de Uso**

**1. NOME COMERCIAL**

Conjunto de primers e sondas para detecção de *Leptospira* spp. (FAM) – 20 reações.

**2. FINALIDADE DO TESTE**

O conjunto de reagentes é utilizado para a detecção de sequências do DNA de *Leptospira* spp. a partir de amostras biológicas submetidas a métodos de extração e purificação de DNA.

**Uso exclusivo em pesquisa (RUO).**

**3. PRINCÍPIO DO TESTE**

A técnica de PCR em Tempo Real (qPCR) permite determinar a presença da sequência alvo de DNA, através da amplificação de parte de regiões específicas de material genético e multiplicar em milhões de cópias. Para que seja possível amplificar determinado fragmento, é necessário conhecer a sequência a ser amplificada e utilizar alguns reagentes e componentes específicos. Não é recomendado o uso de “Referência Passiva” durante a reação de qPCR. Desabilite esta opção na programação do equipamento a ser utilizado.

**4. TIPOS DE AMOSTRAS, CONDIÇÕES PARA COLETA, MANUSEIO, PREPARO E PRESERVAÇÃO**

Amostras biológicas com suspeita da presença de *Leptospira* spp. O material coletado deve ser armazenado de 4 a 8°C por até 48h, -20°C por até 30 dias ou -80°C por tempo indeterminado. Para realização do teste as amostras devem ser submetidas ao processo de extração de DNA de escolha do operador. O material genético extraído deve ser conservado de 4 a 8 °C por até 12h, -20 °C por até 30 dias ou -80 °C por tempo indeterminado.

**Nota:** Não recomendamos que as amostras sejam submetidas ao processo de *pool* com risco de interferência no resultado, podendo apresentar resultados falso-negativos.

**5. DESCRIÇÃO DO PRODUTO**

| COMPONENTES<br>50 Reações                           | DESCRIÇÃO                                                  | QUANTIDADE | VOLUME |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------|--------|
| 2X Tampão de reação<br>RT-qPCR                      | Mistura para qPCR                                          | 1 frasco   | 1,0 mL |
| Primers e Probes<br><i>Leptospira</i> spp.<br>(FAM) | Oligonucleotídeos e Sondas<br>Fluorescentes                | 1 frasco   | 40 µL  |
| Enzima qPCR                                         | Mix de Enzimas                                             | 1 frasco   | 20 µL  |
| Água ultrapura                                      | Água ultrapura<br>DNAse e RNAse Free                       | 1 frasco   | 1,0 mL |
| Controle Positivo<br>250.000 cópias/reação          | Controle positivo Sintético<br>para <i>Leptospira</i> spp. | 1 frasco   | 100 µL |

Tabela 1. Componentes do kit de amplificação

## 6. EQUIPAMENTOS, REAGENTES E INSUMOS NÃO FORNECIDOS

Equipamentos: Workstation para PCR, micropipetas calibradas de volume variável (0,5 a 1000µL), agitador tipo Vórtex e termociclador de PCR em Tempo Real com filtros para leitura do fluoróforo FAM.

Insumos: Microtubos de 0,2, 1,0 a 2 mL, ponteiros com filtro de 0,5 a 1000µL, placas ou tubos de PCR específicas de acordo com o modelo/ fabricante do termociclador e selantes óticos para as placas de PCR de acordo com o modelo/fabricante do termociclador qPCR.

Nota: Importante trabalhar com equipamentos em boas condições de uso e com manutenções preventivas em dia.

## 7. ESPECIFICAÇÃO DE DESEMPENHO

- Limitação de detecção\* (95% de detecção): 500 cópias/mL
- Sensibilidade\*: 500 cópias/mL
- Especificidade: NA
- Reação Cruzada: NA

\*Cópias/mL do ácido nucleico extraído.

## 8. PROCEDIMENTO

### 8.1. Preparo do MIX

- Preparar Mix da reação, conforme a Tabela 2, em tubo de 1,5 mL.
- Adicione 15µL do Mix da reação em tubos de 0,2mL ou placas, de acordo com o equipamento.
- Para amostras: Adicione 5µL da respectiva amostra ao poço contendo o mix da reação. Homogeneíze com auxílio de uma pipeta.
- Para o controle positivo: Adicione 5µL do Controle Positivo em um poço contendo o mix da reação. Homogeneíze com auxílio de uma pipeta.
- Para o controle negativo: Adicione 5µL de água ultrapura em um poço contendo o mix da reação. Homogeneíze com auxílio de uma pipeta.
- Levar ao equipamento para a leitura.

Observação<sup>1</sup> - Todo o procedimento deve ser feito com os tubos em gelo.

Observação<sup>2</sup> - Não deve ser ultrapassado 30 minutos entre o preparo do Mix e o início da leitura da reação no equipamento.

Observação<sup>3</sup> - Dar spin nos tubos antes de utilizá-los.

|                                               | Reação 1       |
|-----------------------------------------------|----------------|
| 2X Tampão de reação RT- qPCR                  | 10,0 µL        |
| Primers e Probes <i>Leptospira</i> spp. (FAM) | 2,0 µL         |
| Enzima qPCR                                   | 1,0 µL         |
| Água                                          | 2,0 µL         |
| <b>Volume total do mix</b>                    | <b>15 µL</b>   |
| Controle Positivo ou Amostra                  | 5,0 µL         |
| <b>Volume final de reação</b>                 | <b>20,0 µL</b> |

Tabela 2. Preparo do Mix de reação

NOVA BIOTECNOLOGIA LTDA

R. PASADENA, 235 - PARQUE INDUSTRIAL SAN JOSE CEP: 06715-864 - COTIA/SP - BRASIL

## 8.2. Configuração do equipamento

Defina os canais de fluorescência e programe o *termociclador*, de acordo com as instruções do fabricante. O volume total da reação é de 20µL, um controle positivo e um negativo são necessários para cada ensaio, independentemente da quantidade de amostras processadas.

O equipamento deve ser configurado em 2 etapas, conforme descrito na Tabela 3:

| Etapa | Temperatura | Tempo       | Ciclos |
|-------|-------------|-------------|--------|
| 1     | 95°C        | 2 minutos   | 1      |
| 2     | 95°C        | 15 segundos | 40     |
|       | 60°C*       | 45 segundos |        |

Tabela 3. Programa de ciclagem

\* selecionar a leitura da fluorescência na etapa 2 – 60 °C.

\*\*desativar a opção “Referência Passiva” no equipamento.

Canais de detecção do setup de Programas de fluorescências:

| Alvo                   | Fluoróforo |
|------------------------|------------|
| <i>Leptospira</i> spp. | FAM        |

Tabela 4. Canais de detecção

## 9. INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

As amostras que apresentarem sinal de fluorescência, isto é, amplificação para o alvo no canal de fluorescência **FAM** com Ct abaixo de 37 serão consideradas positivas para a detecção do respectivo alvo.

O resultado do teste será considerado **DETECTADO OU POSITIVO**.

As amostras que **NÃO** apresentarem sinal de fluorescência, isto é, não amplificarem para o alvo no canal de fluorescência **FAM** serão consideradas negativas para a detecção do respectivo alvo.

O resultado do teste será considerado **NÃO DETECTADO (ND) OU NEGATIVO**

| Alvo                         | Resultado Ct (fluoróforo) | Interpretação                        |
|------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| <i>Leptospira</i> spp. (FAM) | <37 (FAM)                 | Positivo para <i>Leptospira</i> spp. |
|                              | ND                        | Negativo para <i>Leptospira</i> spp. |

Tabela 5. Interpretação dos resultados

**Nota:** Para liberação dos resultados quantitativos, acessar a tabela de conversão disponibilizada.

## 10. FONTES POTENCIAIS DE VARIABILIDADE

| Problema                                                                  | Provável Causa                                                            | Recomendação                                                                                                                                                                                                |
|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sem detecção de sinal em nenhum dos canais, incluindo o controle positivo | Operação inadequada do equipamento                                        | Verificar a calibração do equipamento e repetir a reação sob condições corretas.                                                                                                                            |
|                                                                           | Preparo incorreto da reação                                               | Checar todos os reagentes e repetir reação                                                                                                                                                                  |
|                                                                           | Reagentes armazenados de forma inadequada                                 | Repetir a reação com novos reagentes                                                                                                                                                                        |
| Sem detecção de sinal do Controle Positivo.                               | Preparação incorreta da reação.                                           | Verificar o protocolo e repetir a reação.                                                                                                                                                                   |
|                                                                           | Armazenamento inadequado da reação e/ou possível contaminação da amostra. | Evitar congelar e descongelar mais de 4 vezes. Quando descongelado, manter o controle positivo em gelo, isso irá impedir a degradação. Se possível aliquotar o controle e utilize apenas quando necessário. |

Tabela 6. Possíveis problemas encontrados.

## 11. CONTROLE INTERNO DA QUALIDADE (CIQ)

A validade do resultado do teste é comprovada pela utilização dos controles positivos e negativos.

O **Controle Negativo** de amplificação serve para garantir a especificidade da reação na detecção dos alvos e que não houve contaminação com DNA do patógeno em nenhum dos passos de preparo da placa de PCR.

A amplificação do **Controle Positivo** deverá apresentar um Ct abaixo de 37, para garantir que os reagentes utilizados são efetivos para detectar os alvos relacionados.

## 12. INTERFERÊNCIAS

Resíduos de fenol, clorofórmio, sais e etanol provenientes da purificação do DNA. Para tanto, recomenda-se uma padronização da eficiência de extração com elevado rendimento para evitar estes interferentes.

## 13. FÓRMULAS DE CÁLCULO DOS RESULTADOS COM EXEMPLOS

Não aplicável

## 14. INTERVALOS BIOLÓGICOS DE REFERÊNCIA

Não aplicável

## 15. INTERVALO REPORTÁVEL

Não aplicável

**16. VALORES CRÍTICOS**

Não aplicável

**17. ARMAZENAMENTO, TRANSPORTE E VALIDADE**

O Kit deve ser armazenado a - 20°C em freezer com degelo manual. O armazenamento em freezers modelo *frost free* pode levar a perda de reagentes.

Verificar validade e data de fabricação na caixa do produto.

**18. ESTABILIDADE APÓS ABERTO**

Após aberto o kit deve ser armazenado à -20 °C. Verificar validade e data de fabricação na caixa do produto.

O processo de congelamento e descongelamento do kit pode levar a degradação dos reagentes neles presentes, evitar descongelar o kit mais de 4 vezes.

**19. INFORMAÇÃO DE SEGURANÇA**

- Sempre que estiver trabalhando com soluções químicas e amostras biológicas, EPIs são necessários conforme normas de segurança regulamentadas.
- Depois de receber o produto verificar se a embalagem está danificada ou se há vazamento. Se houver danos ou com vazamento, usar luvas e óculos de proteção quando descartar os frascos para evitar acidentes.
- Não usar componentes danificados, pois eles podem gerar baixo rendimento.
- Sempre trocar as ponteiros entre as transferências de líquidos para evitar a contaminação cruzada.
- Não misturar componentes de kits diferentes, se não forem do mesmo produto e do mesmo lote.
- Este produto deve ser usado apenas por pessoal treinado.
- Armazenar os químicos e plásticos em condições próprias para uso em laboratório.
- Contaminações causadas pelos resíduos são raríssimas, mas não podem ser completamente descartadas. Portanto, os resíduos devem ser considerados como material infeccioso e devem ser manuseados de acordo com as normas de segurança regulamentadas.
- Caso sejam necessárias mais informações a respeito do produto, favor entrar em contato com a NOVA BIOTECNOLOGIA.

**20. PRECAUÇÕES E CUIDADOS ESPECIAIS**

- Utilizar somente seguindo as instruções acima indicadas;
- Abrir a embalagem o mais próximo possível no momento do uso;
- Evitar o contato direto com a pele, olhos e/ou roupas;
- Recomenda-se a utilização de luvas para aplicação do produto;
- Conservar a embalagem em local fresco e seco;
- Não reutilizar a embalagem vazia;
- Não misturar com outros produtos;
- Manter o produto em sua embalagem original.

**21. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Aymée L, Di Azevedo MIN, Borges ALDSB, Carvalho-Costa FA, Lilenbaum W. *Leptospira* spp. strains associated with Bovine Genital Leptospirosis (BGL). *Microb Pathog.* 2022;173(Pt A):105841. doi:10.1016/j.micpath.2022.105841

Lekhal L, Harran E, Aragon A, et al. First Molecular Detection of Pathogens *Leptospira* in Common Rodent Captured in North Algeria Urban Areas. *Trop Med Infect Dis.* 2022;7(11):335. Published 2022 Oct 29. doi:10.3390/tropicalmed7110335

Monti G, Tomckowiack C, Salgado M. Diagnostic accuracy of an immunomagnetic separation-PCR assay to detect pathogenic *Leptospira* spp. in urine from dairy cattle, using a Bayesian latent class model. *Prev Vet Med.* 2023;213:105859. doi:10.1016/j.prevetmed.2023.105859

**Informações do Fabricante****NOVA BIOTECNOLOGIA LTDA**

R. PASADENA, 235 - PARQUE INDUSTRIAL SAN JOSE

CEP: 06715-864 - COTIA/SP - BRASIL

CNPJ: 24.096.423/0001-15

**RESPONSÁVEL TÉCNICO**

Dr. Rafael Almeida Ferreira de Abreu

CRMV: 29772

**Atendimento ao Consumidor**

Tel. +55 (11) 4243-2356

[www.novabiotecnologia.com.br](http://www.novabiotecnologia.com.br)

e-mail: [assessoria@novabiotecnologia.com.br](mailto:assessoria@novabiotecnologia.com.br)

[sac@novabiotecnologia.com.br](mailto:sac@novabiotecnologia.com.br)