

Protocolo de uso do conjunto de primers e sondas para detecção de Controle Interno exógeno IAC (CY5) por PCR em Tempo Real (qPCR)

IAC-50

50 reações

Transporte: -20°C

1. USO PRETENDIDO

O **Controle Interno de Amplificação (IAC)** é utilizado como controle interno exógeno de extração e/ou amplificação.

2. PRINCÍPIO DO TESTE

Um dos principais problemas que surgem ao detectar patógenos por PCR, seja sequências alvos de DNA ou RNA, é a inibição da reação de amplificação devido aos componentes da amostra que está sendo testada.

Resultados falso-negativos devido a reagentes vencidos, técnica inadequada ou outras causas podem ser eliminados usando padrões de DNA ou RNA, que são amplificados independentemente. No entanto, resultados falso-negativos devido à inibição da matriz não podem ser detectados tão facilmente. Portanto, está se tornando imperativo que esses tipos de ensaios incluam um controle interno de amplificação (IAC) em cada tubo de reação de PCR.

O IAC é uma molécula de DNA exógena e, portanto, não pode resolver o problema de resultados falso-negativos devido a coleta inadequada e/ou transporte da amostra. Contudo, ele atua como um controle não competitivo, que não compartilha primers ou sondas com as sequências alvo a serem detectadas na reação, o que possibilita seu uso com qualquer ensaio.

3. EQUIPAMENTOS 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 dos fluoróforos Cy5.

Insumos: Microtubos de 0,2, 1,0 a 2 mL, ponteiras 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.

Reagentes disponibilizados:

Componentes	Descrição	Quantidade	Volume
2X Tampão de Reação RT-qPCR	Mistura de qPCR	1 frasco	1,0 mL
Primers e Probes IAC - Cy5	Oligonucleotídeos e Sondas Fluorescentes	1 frasco	100 µL
Enzima qPCR	Tampão da Enzima	1 frasco	50 µL
Água	Água ultrapura <i>DNase</i> e <i>RNase Free</i>	1 frasco	1 mL
Controle Positivo	DNA Sintético para IAC	1 frasco	100 µL

Tabela 1 – Reagentes utilizados na reação

4. PREPARO DA AMOSTRA

O IAC deverá ser adicionado nas amostras (10uL) antes do procedimento de extração de **DNA e/ou RNA**.

5. REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

- 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.
- Adicione 5µL da amostra ao poço contendo o mix da reação.
- Adicione 5µL do Controle Positivo em um diferente poço contendo o mix da reação.
- Homogeneíze com auxílio de uma pipeta.
- Levar ao equipamento para a leitura.

Observação¹ - Todo o procedimento deve ser feito com os tubos em gelo.

Observação² - Não deve ser ultrapassado 30 minutos entre o preparo do Mix e o início da leitura da reação no equipamento.

Reação 1	
2X Tampão de reação RT-qPCR	10,0 µL
Primers e Probes IAC/ CY5	2,0 µL
Enzima qPCR	1,0 µL
Água	2,0 µL
Controle Positivo ou Amostra	5,0 uL
Volume final de reação	20,0 µL

Tabela 2 – Preparo do Mix de reação

6. CONFIGURAÇÃO DO EQUIPAMENTO DE PCR EM TEMPO REAL

Defina os canais de fluorescência e programe o *termociclador*, de acordo com as instruções do fabricante.

O volume total da reação é de 20uL, um controle positivo e um negativo são necessários para cada ensaio, independentemente da quantidade de amostras processadas.

O IAC-50 foi configurado para ser executado em conjunto com todos os insumos de detecção de patógenos veterinários da empresa **NOVA BIOTECNOLOGIA**.

Programação do equipamento de PCR em Tempo Real:

1- Para uso apenas do IAC-50:

O equipamento deve ser configurado em 2 etapas caso e, 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	

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

**desativar a opção "Referência Passiva" no equipamento.

Tabela 3 – Programa de ciclagem

2- Para uso com os reagentes de detecção de patógenos veterinários de DNA da empresa NOVA BIOTECNOLOGIA.

O equipamento deve ser configurado em 2 etapas caso e, conforme descrito na Tabela 4:

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	95 °C	2 minutos	1
2	95 °C	15 segundos	40
	50-60 °C*	45 segundos	

* selecionar a leitura da fluorescência na etapa 2 – 50-60 °C.

**desativar a opção "Referência Passiva" no equipamento.

Tabela 4 – Programa de ciclagem

3- Para uso com os reagentes de detecção de patógenos veterinários de RNA da empresa NOVA BIOTECNOLOGIA.

O equipamento deve ser configurado em 3 etapas caso e, conforme descrito na Tabela 5:

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	55 °C	45 minutos	1
2	95 °C	2 minutos	1
3	95 °C	15 segundos	40
	50-60 °C*	45 segundos	

* selecionar a leitura da fluorescência na etapa 3 – 50-60 °C.

**desativar a opção "Referência Passiva" no equipamento.

Tabela 5 – Programa de ciclagem

Canais de detecção do setup de Programas de fluorescências:

Alvo	Fluoróforo
IAC	CY5

Tabela 6 – Canais de detecção

7. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

As amostras que apresentarem sinal de fluorescência, isto é, amplificação para o alvo no canal de fluorescência **Cy5** com Ct abaixo de 40 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 **Cy5** serão consideradas como **INVÁLIDAS**. Neste caso se faz necessário a repetição da extração e à amplificação.

8. POSSÍVEIS PROBLEMAS ENCONTRADOS

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 IAC	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 o várias vezes. Quando descongelado, manter o controle positivo em gelo, isso irá impedir a degradação. Se possível alíquotar o controle e utilize apenas no uso.

9. FONTES POTENCIAIS DE VARIABILIDADE

Pipetagem, calibração de pipetas e qualidade do DNA/RNA extraído.

10. INTERFERÊNCIAS

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

11. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- *A versatile internal control for use as DNA in real-time PCR and as RNA in real-time reverse transcription PCR assays* D.M. Deer, K.A. Lampel and N. Gonza íez-Escalona Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration, College Park, MD, USA. *Journal compilation* ^a 2010 The Society for Applied Microbiology, *Letters in Applied Microbiology* 50 (2010) 366–372 No claim to original US government works.

