

Conjunto de primers e sondas para detecção de *Salmonella typhimurium*, *enteritidis*, *gallinarum* e *pullorum* por PCR em Tempo Real (PCR)

Código: SALMTIP-50

50 reações

Transporte: -20°C

1. USO PRETENDIDO

O conjunto de reagentes é utilizado para a detecção de sequências do DNA dos sorovares de *Salmonella typhimurium*, *enteritidis*, *gallinarum* ou *pullorum* em amostras de alimentos como leite, laticínios, carnes, ovos, peixes e crustáceos.

2. PRINCÍPIO DO TESTE

O conjunto de reagentes para detecção molecular dos sorovares de *Salmonella* por PCR em Tempo Real (qPCR) é indicado para uso em amostras de alimentos previamente submetidas a um processo de liberação de ácidos nucleicos através do rompimento da membrana pelo método de *boiling*.

A detecção dos sorovares de *Salmonella (typhimurium, enteritidis, gallinarum ou pullorum)* se baseia na técnica de PCR em tempo real. Esta técnica permite determinar a presença do DNA alvo, através da amplificação de parte de sequências 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.

3. EQUIPAMENTOS E INSUMOS NÃO FORNECIDOS

Equipamentos: *Workstation* para PCR, micropipetas calibradas de volume variável (0,5 a 1000µL), agitador tipo Vórtex, banho maria ou estufa e termociclador de PCR em Tempo Real com filtros para leitura dos fluoróforos FAM e HEX.

Insumos: Microtubos de 1,0 a 2 mL, ponteiros com filtro de 0,5 a 1000µL, placas 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 mL
Primers e Probes <i>Salmonella enteritidis</i> HEX e <i>Salmonella typhimurium</i> FAM	Oligonucleotídeos e Sondas Fluorescentes	1 frasco	100 µL
Primers e Probes <i>Salmonella gallinarum</i> FAM e <i>Salmonella pullorum</i> HEX	Oligonucleotídeos e Sondas Fluorescentes	1 frasco	100 µL
Enzima qPCR	Tampão da Enzima Hot Start Taq DNA polimerase	1 frasco	100 µL

Água	Água ultrapura <i>DNase</i> e <i>RNase Free</i>	1 frasco	2 mL
Controle Positivo	DNA Sintético para <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>enteritidis. gallinarum</i> e <i>pullorum</i> .	Controle Positivo	100 µL

Tabela 1 – Reagentes utilizados na reação

4. PREPARO DA AMOSTRA

Suspensão do material genético via *boiling*:

- Amostras previamente incubadas em água peptonada 1%, à 37 °C por 24h, devem ser homogeneizadas e transferidas para um tubo de 50 mL.
- Separar 1mL e transferir para tubo 1,5 mL.
- Centrifugar a 10.000 rpm durante 1 min.
- Descartar o sobrenadante sem perturbar o *pellet*
- Adicionar 1 mL de H₂O, livre de *DNAses* e homogeneizar em agitador tipo vórtex por 10 segundos.
- Centrifugar a 10.000 rpm, por 1 min
- Repetir os passos 'e' e 'f'
- Adicionar 0,1 mL de H₂O, livre de *DNAses*
- Aquecer a 95 °C por 8 min (banho maria, estufas ou placas de aquecimento podem ser utilizados)
- Abrir o tubo contendo amostra para liberar vapores formados
- Homogeneizar em agitador tipo vórtex por 10 segundos
- Centrifugar a 10.000 rpm, por 1 min
- Separar o sobrenadante para reação de PCR e descartar o *pellet*

Amostras devem ser armazenadas em gelo ou à 4 °C, até momento do uso, ou a -20°C para armazenamento em longos períodos.

5. REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

- Preparar Mix da reação, conforme a Tabela 2, em tubo de 1,5 mL.
- Adicione 20µL do Mix da reação em tubos de 0,2mL.
- Adicione 5µL da amostra ao tubo plástico contendo o mix da reação.
- Adicione 5µL do Controle Positivo ao tubo plástico contendo o mix da reação.
- Homogeneíze em vórtex os tubos.
- Centrifugue os tubos por 10 segundos.
- 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	Reação 2
2X Tampão de reação RT-qPCR	7,0 µL	7,0 µL
Primers e Probes <i>Salmonella enteritidis</i> HEX e <i>Salmonella typhimurium</i> FAM	2,0 µL	-
Primers e Probes <i>Salmonella gallinarum</i> FAM e <i>Salmonella pullorum</i> HEX	-	2,0 µL
Enzima qPCR	1,0 µL	1,0 µL
Água	10,0 µL	10,0 µL
Controle Positivo ou Amostra	5,0 uL	5,0 uL
Volume final de reação	25,0 µL	25,0 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 25uL, um controle positivo e um negativo são necessários para cada ensaio, independentemente da quantidade de amostras processadas.

O equipamento deve ser configurado em 4 etapas, conforme descrito na Tabela 3:

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	95 °C	15 minutos	1
2	95 °C	15 segundos	40
3	60 °C	60 segundos	

Tabela 3 – Programa de ciclagem

Canais de detecção do setup de Programas de fluorescências:

Alvo	Fluoróforo
<i>Salmonella typhimurium</i>	FAM
<i>Salmonella enteritidis</i>	HEX
<i>Salmonella gallinarum</i>	FAM
<i>Salmonella pullorum</i>	HEX

Tabela 4 – Canais de detecção

7. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

As amostras que apresentarem sinal de fluorescência, isto é, amplificação para o alvo no canal de fluorescência FAM ou HEX 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 FAM ou HEX, serão consideradas negativas para a detecção do respectivo alvo.

O resultado do teste será considerado **NÃO DETECTADO OU NEGATIVO**

As amostras que **NÃO** apresentarem sinal de fluorescência, isto é, não amplificarem para o alvo no canal de fluorescência FAM e **NÃO** apresentarem um valor de Ct do controle interno (IC) no canal de fluorescência HEX ou VIC, o resultado do teste será considerado **INVÁLIDO** e o teste deverá ser repetido com uma nova amostra.

Alvo	Resultado Ct (fluoróforo)	Interpretação
<i>S. typhimurium</i> (FAM)	<40 (FAM)	Positivo para <i>S. typhimurium</i>
	ND (HEX)	
<i>S. enteritidis</i> (HEX)	ND (FAM)	Positivo para <i>S. enteritidis</i>
	<40 (HEX)	
<i>S. gallinarum</i> (FAM/HEX)	<40 (FAM)	Positivo para <i>S. gallinarum</i>
	<40 (HEX)	
<i>S. pullorum</i> (HEX)	ND (FAM)	Positivo para <i>S. pullorum</i>
	<40 (HEX)	

Tabela 5 – Interpretação dos resultados

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
Controle positivo com Ct superior a 40.	Preparação incorreta da reação.	Verificar o protocolo e repetir a reação.

	<p>Armazenamento inadequado da reação e/ou possível contaminação da amostra.</p>	<p>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.</p>
--	--	--

9. CONTROLE INTERNO DA QUALIDADE

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 Alvos FAM** deverá apresentar um **Ct abaixo de 40**, para garantir que os reagentes utilizados são efetivos para detectar os alvos relacionados ao painel respiratório *ao canal de fluorescência FAM*.

A amplificação do **Controle Positivo Alvos HEX** deverá apresentar um **Ct abaixo de 40**, para garantir que os reagentes utilizados são efetivos para detectar os alvos relacionados ao painel respiratório *ao canal de fluorescência HEX ou VIC*.

10. FONTES POTENCIAIS DE VARIABILIDADE

Pipetagem, calibração de pipetas e qualidade do DNA extraído.

11. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade: superior a 0.5 UFC/25gr

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. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- International Organization for Standardization; Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions; ISO 22174:2005
- International Organization for Standardization; Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations; ISO 7218:2007
- International Organization for Standardization; Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method; ISO 16140-2

