

CONJUNTO DE PRIMERS PARA DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS AVIÁRIO (SYBR) ADENOSPP-50

Instruções de Uso

1. NOME COMERCIAL

Conjunto de primers e sondas para detecção de Adenovírus aviário (SYBR) – 50 reações

2. FINALIDADE DO TESTE

O conjunto de reagentes é utilizado para a detecção de sequências do DNA de Adenovírus aviário a partir de amostras biológicas submetidas a métodos de extração e purificação de DNA. **O Kit é de uso EXCLUSIVO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO.**

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 Adenovírus aviário (sangue, swab orofaríngea, saliva, swab de órgãos, cultura microbiológica). O material coletado deve ser armazenado de 4 – 8 °C por até 48h, -20 °C por até 30 dias ou -70 °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 4 – 8 °C por até 12h, -20 °C por até 30 dias ou -70 °C por tempo indeterminado.

5. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

COMPONENTES 50 Reações	DESCRIÇÃO	QUANTIDADE	VOLUME
2X qPCR Master Mix Sybr	Mistura de qPCR com sonda fluorescente	1 frascos	1 mL
<i>Primers Adenovirus spp</i>	Oligonucleotídeos	1 frasco	100 µL
Água ultra pura	Água ultrapura DNase e RNase Free	1 frasco	1 mL
Controle Positivo (5µL = 2.500.000 Cópias/mL)	DNA Sintético para Adenovírus aviário	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 SYBR.

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.

7. ESPECIFICAÇÃO DE DESEMPENHO

- Limitação de detecção (95% de detecção) = 1000 cópias/mL
- Sensibilidade = 1000 cópias/mL
- Especificidade = NA
- Reação Cruzada = NA

8. PROCEDIMENTO

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.
- 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 qPCR Master Mix Sybr	10,0 µL
Primers Adenovirus spp (Sybr)	2,0 µL
Água	3,0 µL
Amostra	5,0 uL
Volume final de reação	20,0 µL

Tabela 2. Preparo do Mix de reação

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 20uL, 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	5 minutos	1
	95 °C	15 segundos	40
	60 °C*	60 segundos	
3	Adicionar a curva de dissociação/melting. Usar configuração padrão do equipamento		1

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

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

Tabela 3 – Programa de ciclagem

Canais de detecção do setup de Programas de fluorescências:

Alvo	Fluoróforo
Adenovírus spp	SYBR

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 **Sybr Green** com Tm de acordo com a tabela 5, serão consideradas **DETECTADAS OU POSITIVAS**.

As amostras que não apresentarem sinal de fluorescência, isto é, amplificação para o alvo no canal de fluorescência **Sybr Green** com Tm de acordo com a tabela 5, serão consideradas **NÃO DETECTADAS OU NEGATIVAS**.

Alvo	Resultado Tm
Adenovírus spp (Sybr)	89,7 (± 0,5)

Tabela 5 – Temperaturas de Melting

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 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.

Tabela 6. Possíveis problemas encontrados.

11. CONTROLE INTERNO DA QUALIDADE (CIQ)

- Controle negativo aprovado
- Controle positivo aprovado

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* podem levar a perda de reagentes.

O Kit pode tem validade de 1 ano após a data de fabricação (verificar validade e data de fabricação na caixa do produto)

18. ESTABILIDADE APÓS ABERTO

Após aberto o kit deve ser armazenado à -20 °C por até 1 ano após a data de fabricação.

O processo de congelamento e descongelamento do kit pode levar a degradação dos reagentes neles presentes

Informações do Fabricante**NOVA BIOTECNOLOGIA LTDA**

R. PASADENA, 235 - PARQUE INDUSTRIAL SAN JOSE

CEP: 06.715-864 - COTIA/SP - BRASIL

CNPJ: 24.096.423/0001-15

RESPONSÁVEL TÉCNICO

Dr. Rafael Almeida Ferreira de Abreu

CRVM 29772

Atendimento ao Consumidor

Tel: +55 (11) 4243-2356

www.novabiotecnologia.com.br

e-mail: assessoria@novabiotecnologia.com.br

sac@novabiotecnologia.com.br