

**CONJUNTO DE PRIMERS E SONDAS PARA DETECÇÃO DE *EHRlichia SPP* (HEX)****HEXSPP-50****Instruções de Uso****1. NOME COMERCIAL**

Conjunto de primers e sondas para detecção de *Ehrlichia spp* (HEX) – 50 reações

**2. FINALIDADE DO TESTE**

O conjunto de reagentes é utilizado para a detecção de sequências do DNA de *Ehrlichia spp* 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 *Ehrlichia spp* (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 Tampão de reação RT-qPCR	Mistura de qPCR	1 frasco	1,0 mL
Primers e Probes <i>Ehrlichia spp</i> (HEX)	Oligonucleotídeos e Sondas Fluorescentes	1 frasco	100 µL
Enzima qPCR	Tampão da Enzima	1 frasco	50 µL
Água ultra pura	Água ultrapura DNase e RNase Free	1 frasco	1,0 mL
Controle Positivo (5µL = 2.500.000 Cópias/mL)	DNA Sintético para <i>Ehrlichia spp</i>	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 dos fluoróforos FAM, HEX e ROX.

**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) = 500 cópias/mL
- Sensibilidade = 500 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.

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.

Reação 1

2X Tampão de reação RT-qPCR	10,0 µL
Primers e Probes <i>Ehrlichia spp</i> (HEX)	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

### 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	2 minutos	1
2	95 °C	15 segundos	40
	55 °C*	45 segundos	

\* selecionar a leitura da fluorescência na etapa 2 – 55 °C.

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

Tabela 3 – Programa de ciclagem

Canais de detecção do setup de Programas de fluorescências:

Alvo	Fluoróforo
<i>Ehrlichia spp</i>	HEX

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 **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 **HEX** serão consideradas negativas para a detecção do respectivo alvo.

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

Alvo	Resultado Ct (fluoróforo)	Interpretação
<i>Ehrlichia spp</i> (HEX)	<b>&lt;40 (HEX)</b>	Positivo para <i>Ehrlichia</i>
	ND (HEX)	Negativo para <i>Ehrlichia</i>

Tabela 5 – Interpretação dos resultados

## 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](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)