

**CONJUNTO DE PRIMERS E SONDAS PARA DETECÇÃO SALMONELLA TYPHIMURIUM (FAM),  
ENTERITIDIS (HEX), GALLINARUM (FAM/HEX) E PULLORUM (HEX) - RUO  
SALMTIP-50**

**Instruções de Uso**

**1. NOME COMERCIAL**

Conjunto de primers e sondas para detecção de *Salmonella typhimurium* (FAM) e *S. enteritidis* (HEX), *S. gallinarum* (FAM) e *S. pullorum* (HEX) – 50 reações.

**2. FINALIDADE DO TESTE**

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

**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 de alimentos como leite, laticínios, carnes, ovos, peixes e crustáceos com suspeita da presença *Salmonella typhimurium*, e *S. enteritidis*, *S. gallinarum* e/ou *S. pullorum*. 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	DESCRIÇÃO	QUANTIDADE	VOLUME
50 Reações			
2X Tampão de reação RT-qPCR	Mistura para qPCR	1 frasco	1,0 mL
Primers e Probes <i>Salmonella typhimurium</i> (FAM) e <i>Salmonella enteritidis</i> (HEX)	Oligonucleotídeos e Sondas Fluorescentes	1 frasco	100 µL
Primers e Probes <i>Salmonella gallinarum</i> (FAM/HEX) e <i>Salmonella pullorum</i> (HEX)	Oligonucleotídeos e Sondas Fluorescentes	1 frasco	100 µL

NOVA BIOTECNOLOGIA LTDA

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

Enzima qPCR	Mix de Enzimas	1 frasco	50 µL
Água ultrapura	Água ultrapura DNAse e RNAse Free	1 frasco	1,0 mL
Controle Positivo 250.000 cópias/reação	Controle positivo Sintético para DNA Sintético para <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>S.</i> <i>enteritidis</i> , <i>S. gallinarum</i> e <i>S. pullorum</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 do fluoróforo FAM, HEX.

**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.

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. Sugestão de Processamento da Amostra (Suspensão do material genético via *boiling*)

- Amostras previamente incubadas em água peptonada 1%, à 37 °C por 24h, devem ser homogêneas e transferidas para um tubo de 50 mL;
- Separar 1mL da amostra (item a) 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 H<sub>2</sub>O, livre de DNAse e homogeneizar em agitador tipo vórtex por 10 segundos;
- Centrifugar a 10.000 rpm, por 1 min;
- Repetir os passos do item “D” ao item “F” 1x;
- Descartar o sobrenadante sem perturbar o pellet;
- Adicionar 100 µL de H<sub>2</sub>O, livre de DNAse homogeneizar em agitador tipo vórtex por 10 segundos;
- 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;
- Fechar o tubo e homogeneizar em agitador tipo vórtex por 10 segundos;
- Centrifugar a 10.000 rpm, por 1 min;
- Transferir o sobrenadante para outro microtubo e descartar o pellet.

O material genético (item “n”) devem ser armazenadas em gelo ou à 4 °C, até momento do uso, ou a -20°C para armazenamento em longos períodos.

### 8.2. Preparo do MIX

- a) Preparar Mix da reação, conforme a Tabela 2, em tubo de 1,5 mL.
- b) Adicione 20µL do Mix da reação em tubos de 0,2mL ou placas, de acordo com o equipamento.
- c) Para amostras: Adicione 5µL da respectiva amostra ao poço contendo o mix da reação. Homogeneíze com auxílio de uma pipeta.
- d) Para o controle positivo: Adicione 5µL do Controle Positivo em um poço contendo o mix da reação. Homogeneíze com auxílio de uma pipeta.
- e) Para o controle negativo: Adicione 5µL de água ultrapura em um poço contendo o mix da reação. Homogeneíze com auxílio de uma pipeta.
- f) 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.

	<b>Volume por reação MIX 1</b>	<b>Volume por reação MIX 2</b>
2X Tampão de reação RT- qPCR	7,0 µL	7,0 µL
Primers e Probes <i>Salmonella typhimurium</i> <b>FAM</b> e <i>Salmonella enteritidis</i> <b>HEX</b>	2,0 µL	-
Primers e Probes <i>Salmonella gallinarum</i> <b>FAM/HEX</b> e <i>Salmonella pullorum</i> <b>HEX</b>	-	2,0 µL
Enzima qPCR	1,0 µL	1,0 µL
Água	10,0 µL	10,0 µL
<b>Volume total do mix</b>	<b>20 µL</b>	<b>20 µL</b>
Controle Positivo ou Amostra	5,0 uL	5,0 uL
<b>Volume final de reação</b>	<b>25,0 µL</b>	<b>25,0 µL</b>

Tabela 2. Preparo do Mix de reação

### 8.3. 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 25µL, 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	15 minutos	1
2	95°C	15 segundos	40
	60°C*	60 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>Salmonella typhimurium</i>	<b>FAM</b>
<i>Salmonella enteritidis</i>	<b>HEX</b>
<i>Salmonella gallinarum</i>	<b>FAM/HEX</b>
<i>Salmonella pullorum</i>	<b>HEX</b>

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

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

MIX 1		
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)	

MIX 2		
Alvo	Resultado Ct (fluoróforo)	Interpretação
<i>S. gallinarum</i> (FAM/HEX)	<40 (FAM)	Positivo para <i>S. gallinarum</i>
	ND (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

**Nota:** Amostras positivas para *Salmonella gallinarum* devem amplificar obrigatoriamente nos canais de fluorescência FAM ou FAM e HEX. Se o resultado apresentar fluorescência apenas no canal HEX, indica uma *Salmonella pullorum*.

## 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 alíquotar 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

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.

Shaji S, Selvaraj RK, Shanmugasundaram R. *Salmonella* Infection in Poultry: A Review on the Pathogen and Control Strategies. *Microorganisms*. 2023;11(11):2814. Published 2023 Nov 20. doi:10.3390/microorganisms11112814

### Informações do Fabricante

#### NOVA BIOTECNOLOGIA LTDA

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

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)