

CONJUNTO DE PRIMERS E SONDAS PARA DETECÇÃO DE CONTROLE INTERNO - IAC (CY5) - RUO
IAC-50
Instruções de Uso

1. NOME COMERCIAL

Conjunto de primers e sondas para detecção de Controle Interno Exógeno - IAC (CY5) – 50 reações.

2. FINALIDADE DO TESTE

O conjunto de reagentes é utilizado para a detecção de sequências do DNA de **Controle Interno – IAC (controle exógeno)**, quando previamente adicionado a etapa de Lise nos diferentes métodos de extração e purificação de material genético.

Uso exclusivo em pesquisa (RUO).

3. PRINCÍPIO DO TESTE

O IAC é uma molécula de DNA exógena, utilizada 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. Adicionado na amostra antes do processamento, tem como finalidade o monitoramento do processo de extração de ácidos nucleicos.

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, portanto, e stá se tornando imperativo que esses tipos de ensaios incluam um controle interno de amplificação (IAC) em cada tubo de reação de qPCR.

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

O kit é indicado para amostras biológicas que serão processadas por técnicas de extração de material genético. 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>Controle Interno IAC (Cy5)</i>	Oligonucleotídeos e Sondas Fluorescentes	1 frasco	100 µL
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	DNA Sintético exógeno	1 frasco	1,0 mL
--	-----------------------	----------	--------

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 1000 μ L), agitador tipo Vórtex e termociclador de PCR em Tempo Real com filtros para leitura do fluoróforo Cy5.

Insumos: Microtubos de 0,2, 1,0 a 2 mL, ponteiros com filtro de 0,5 a 1000 μ L, 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. Preparo da amostra

- Colocar 10 μ L do DNA sintético-IAC na amostra após a adição da solução de Lise do kit de extração de DNA e/ou RNA;
- Proceder com o procedimento de extração.
- Separar o material genético para a etapa de amplificação.

8.2. Preparo do MIX

- Preparar Mix da reação, conforme a Tabela 2, em tubo de 1,5 mL.
- Adicione 15 μ L do Mix da reação em tubos de 0,2mL ou placas, de acordo com o equipamento.
- Para amostras: Adicione 5 μ L da respectiva amostra ao poço contendo o mix da reação. Homogeneíze com auxílio de uma pipeta.
- Para o controle positivo: Adicione 5 μ L do Controle Positivo em um poço contendo o mix da reação. Homogeneíze com auxílio de uma pipeta.
- Para o controle negativo: Adicione 5 μ L de água ultrapura em um 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.

Observação³ - Dar spin nos tubos antes de utilizá-los.

	Volume por reação
2X Tampão de reação RT- qPCR	10,0 µL
Primers e Probes Controle Interno IAC (Cy5)	2,0 µL
Enzima qPCR	1,0 µL
Água	2,0 µL
Volume total do mix	15 µL
Controle Positivo ou Amostra	5,0 µL
Volume final de reação	20,0 µL

Tabela 2. Preparo do Mix de reação

8.2. Configuração do equipamento

Defina o canal de fluorescência CY5 e programe o termociclador, de acordo com as instruções do fabricante. O volume total da reação é de 20µL, um controle negativo é necessário para cada ensaio, independentemente da quantidade de amostras processadas.

A reação contendo os reagentes para a amplificação do alvo IAC – CY5 poderá ser usada simultaneamente com os programas das amplificações de outros alvos de DNA ou RNA.

Para reações usando apenas o kit IAC – 50 usar o programa sugerido na tabela 3.

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	95°C	2 minutos	1
2	95°C	15 segundos	40
	60°C*	45 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
Controle Interno IAC	Cy5

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 **Cy5** 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 **Cy5** serão consideradas negativas para a detecção do respectivo alvo.

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

Alvo	Resultado Ct	Interpretação
Controle Interno - IAC (CY5)	<37 (CY5)	DETECTADO (extração válida)
Alvo escolhido	<40	DETECTADO PARA O ALVO ESCOLHIDO
Controle Interno - IAC (CY5)	<37 (CY5)	DETECTADO (extração válida)
Alvo escolhido	ND	NÃO DETECTADO PARA O ALVO ESCOLHIDO
Controle Interno - IAC (CY5)	ND	NÃO DETECTADO
Alvo escolhido	<37	DETECTADO PARA O ALVO ESCOLHIDO
Controle Interno - IAC (CY5)	ND	NÃO DETECTADO (extração inválida)
Alvo escolhido	ND	NÃO DETECTADO

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 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

Moldovan, Elena, and Valeriu Moldovan. "Controls in Real-Time Polymerase Chain Reaction Based Techniques" Acta Marisiensis - Seria Medica, vol. 66, no. 3, University of Medicine, Pharmacy, Science and Technology of Targu Mures, 2020, pp. 79-82. <https://doi.org/10.2478/amma-2020-0025>

Informações do Fabricante

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
e-mail: assessoria@novabiotecnologia.com.br
sac@novabiotecnologia.com.br