

**CONJUNTO DE PRIMERS E SONDAS PARA DETECÇÃO DE SALMONELLA TYPHIMURIUM (FAM),
ENTERITIDIS (HEX), GALLINARUM (FAM/HEX) E PULLORUM (HEX) - RUO
SALMTIP-20**

Instruções de Uso

1. NOME COMERCIAL

Conjunto de primers e sondas para detecção de *Salmonella typhimurium* (FAM) e *S. enteritidis* (HEX), *S. gallinarum* (FAM/HEX) e *S. pullorum* (HEX) – 20 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	40 µL
Primers e Probes <i>Salmonella gallinarum</i> (FAM/HEX) e <i>Salmonella pullorum</i> (HEX)	Oligonucleotídeos e Sondas Fluorescentes	1 frasco	40 µL

NOVA BIOTECNOLOGIA LTDA

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

Enzima qPCR	Mix de Enzimas	1 frasco	20 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, 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.

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 H₂O, 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 H₂O, 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 contendo o material genético para outro microtubo identificado e descartar o pellet

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

8.2. Preparo do MIX

Será necessário o preparo de 2 misturas de reação diferentes (MIX 1 e MIX 2) conforme a Tabela 2. O Material genético extraído deverá ser adicionado nas 2 misturas de reação.

- 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.

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

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>	FAM
<i>Salmonella enteritidis</i>	HEX
<i>Salmonella gallinarum</i>	FAM/HEX
<i>Salmonella pullorum</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 **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)	<37 (FAM)	Positivo para <i>S. typhimurium</i>
	ND (HEX)	
<i>S. enteritidis</i> (HEX)	ND (FAM)	Positivo para <i>S. enteritidis</i>
	<37 (HEX)	
MIX 2		
Alvo	Resultado Ct (fluoróforo)	Interpretação
<i>S. gallinarum</i> (FAM/HEX)	<37 (FAM)	Positivo para <i>S. gallinarum</i>
	ND (HEX)	
<i>S. gallinarum</i> (FAM/HEX)	<37 (FAM)	Positivo para <i>S. gallinarum</i>
	<37 (HEX)	
<i>S. pullorum</i> (HEX)	ND (FAM)	Positivo para <i>S. pullorum</i>
	<37 (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 aliquotar 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

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