

**Conjunto de primers e sondas para detecção do
vírus da Dengue/IAC
DENG-IAC-100 – 100 reações - RUO
Ficha de Instruções de Uso**

1. Uso pretendido

O conjunto de *primers* e sonda para detecção do vírus da Dengue é um teste *in vitro* para a detecção qualitativa do ácido nucléico viral em amostras de plasma, como auxílio para a avaliação das infecções pelo vírus da Dengue. Um conjunto de *primers* e sonda para detectar o IAC (*Internal Amplification Control*) sintético está incluído e deve ser detectado nas amostras extraídas e testadas.

2. Características do Produto

Apresenta um conjunto de *primers* (*forward* e *reverse*) e sonda fluorescente marcada com **FAM** na extremidade 5' e **NFQ** (*non-fluorescent quencher*) na extremidade 3', possuindo 100% de homologia com as sequências dos sub-tipos 1 a 4 do vírus da Dengue. Está incluso também um conjunto de *primers* e sonda para detectar o IAC como controle interno da extração que serve para avaliar a eficiência do processo e deve ser detectado na reação de amplificação no canal **HEX** (para isto, durante a primeira etapa da extração, adicionar 10µL de IAC ao volume da amostra a ser extraída e prosseguir com o protocolo de extração de escolha). Tampão de reação e enzimas apropriadas para a síntese de cDNA por transcrição reversa (RT) e posterior reação de amplificação do DNA.

2.1. Composição do conjunto

Componentes	Conteúdo	Volume
2X Master mix Dengue RT-qPCR	1 frasco/tampa transparente	1.000 µL
Primers/Probe Dengue-G-FAM	1 frasco/tampa âmbar	200 µL
Primers/Probe IAC-HEX	1 frasco/tampa âmbar	200 µL
Enzimas 1-Step RT-qPCR	1 frasco/tampa transparente	40 µL
IAC-Control Int. Extração / Amplificação	1 frasco/tampa transparente	1.500 µL
Controle Positivo da reação	1 frasco transparente/tampa vermelha	100 µL
Água ultra-pura para biologia molecular	1 frasco/tampa transparente	1.500 µL

Tabela 1 – Insumos fornecidos no conjunto da reação

2.2 Especificações

O RNA viral é transcrito em cDNA utilizando um conjunto *primer* específico através da etapa de transcrição reversa, seguido por uma reação de qPCR em um único tubo (*One-Step*). A presença de uma sequência específica do patógeno na reação é detectada por um aumento na fluorescência observada a partir da sonda correspondente duplamente marcada, é relatado como o valor de *threshold* de ciclo (Ct) pelo termociclador em Tempo Real.

Uma reação bem-sucedida, aonde a extração e a amplificação ocorreram de forma eficiente deverá apresentar uma curva de amplificação do IAC-HEX no valor de Ct menor a 37.

2.3 Equipamento necessário, mas não fornecido

Termociclador para PCR em tempo real, com filtros para leitura de FAM/HEX.

Nota: Importante trabalhar com equipamentos em boa condição de uso e com as manutenções

preventivas realizadas oportunamente.

3. Armazenamento e transporte

Os componentes fornecidos devem ser armazenados na embalagem original em temperatura controlada entre -15°C a -25°C, são estáveis até à data de vencimento indicada no rótulo. O produto é fornecido em embalagens com gelo seco que devem garantir uma temperatura de transporte abaixo de -20°C (satisfatória de acordo com os estudos de estabilidade). Congelar o produto imediatamente após o uso. Deve ser evitado o congelamento e o descongelamento dos reagentes por repetidas vezes, pois isso pode reduzir a sensibilidade do ensaio. Recomenda-se separar alíquotas dos reagentes de acordo com suas necessidades após o primeiro descongelamento.

4. Validade

12 meses a partir da data de fabricação.

5. Informação de Segurança

- Os insumos devem ser utilizados somente por pessoal técnico qualificado e devidamente treinado.
- O pessoal técnico deve ser treinado no uso dos termocicladores em Tempo Real, na manipulação de reagentes de biologia molecular e qualificados em protocolos de amplificação de PCR em Tempo Real.
- Todo o pessoal envolvido na execução do teste deve utilizar equipamentos de proteção individual. O uso de objetos perfuro-cortantes deve ser evitado. Além disso, todos devem ser treinados em procedimentos de biossegurança, como recomendado pela legislação em vigor.
- 5.4. Não trocar os componentes entre diferentes lotes de insumos. Recomenda que os componentes entre dois conjuntos de insumos do mesmo lote também não sejam trocados.
- Verificar se os reagentes estão limpos e não contém partículas visíveis pesadas ou grumos. Caso contrário, comunicar o supervisor do laboratório para iniciar os procedimentos necessários para reposição dos insumos.
- Evitar contaminação cruzada das amostras utilizando ponteiras descartáveis e trocando-as após a aplicação de cada amostra.
- Evitar contaminação cruzada entre os reagentes utilizando ponteiras descartáveis e trocando-as entre o uso de cada uma.
- Não utilizar os insumos fornecidos após a data de validade apresentada na etiqueta externa.
- Tratar todas as amostras como potencialmente infectantes. Todas as amostras devem ser manuseadas em Nível de Biossegurança 2, como recomendado pela legislação em vigor. 5.10. Armazenar e extrair as amostras separadamente de outros reagentes e utilizar sala dedicada para o manuseio.
- Realizar os procedimentos o mais rápido possível, mantendo os componentes no gelo ou em reservatório refrigerado.
- O fluxo de trabalho no laboratório deve proceder de maneira unidirecional, começando na área de extração e passando para a amplificação e área de análises de dados. Não retornar as amostras, equipamentos e reagentes para a área onde as primeiras etapas foram realizadas.
- O uso de plásticos descartáveis é recomendado na preparação dos componentes líquidos ou na transferência dos componentes para sistemas automatizados, a fim de evitar contaminação cruzada.
- Os resíduos gerados durante a utilização dos insumos fornecidos devem ser descartados, de acordo com as diretrizes e regras de descarte de resíduos químicos e substâncias biológicas do laboratório, conforme legislação em vigor.
- Os respingos provocados acidentalmente durante o manuseio das amostras devem ser absorvidos por lenços de papel umedecidos com hipoclorito, e em seguida, com água.

- Outros resíduos gerados (exemplo: ponteiros usadas para amostras) devem ser manuseados como potencialmente infectantes e descartados, de acordo com as diretrizes e regras relativas a resíduos laboratoriais.

6. Procedimento

6.1. Reação de PCR em tempo real (RT-qPCR)

- Preparar *Mix* da reação, conforme a Tabela 2, em tubo de 1,5 mL.
- Adicionar 15µL da *Mix* da reação em tubos de 0,2mL ou placas, de acordo com o equipamento.
- Adicionar 5µL da amostra ao poço contendo a mix da reação.
- Adicionar 5µL do Controle Positivo em um diferente poço contendo a mix da reação.
- 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 da *mix* e o início da leitura da reação no equipamento.

Reação 1	
2X <i>Master mix</i> Dengue RT-qPCR	10,0 µL
<i>Primers/Probes</i> Dengue – FAM	2,0 µL
<i>Primers/Probes</i> IAC – HEX	2,0 µL
Enzimas 1-Step RT-qPCR	0,4 µL
Água ultra-pura para biologia molecular	0,6 µL
Amostras, Controle Positivo ou IAC	5,0 µL
Volume final de reação	20,0 µL

Tabela 2 – Preparo da *Mix* de reação

6.2. Configuração do equipamento de PCR em tempo real

Definir os canais de fluorescência e programar o termociclador *real time*, de acordo com as instruções do fabricante.

O volume total da reação é de 20 µL, um controle positivo e um negativo (água) são necessários para cada ensaio, independentemente da quantidade de amostras processadas.

O equipamento deve ser configurado em 3 etapas, conforme descrito na Tabela 3:

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	45°C	15 minutos	1
2	95°C	2 minutos	1
3	95°C	15 segundos	40
	55°C	60 segundos	

Tabela 3 – Programa de ciclagem

6.3. Canais de detecção do setup de Programas de fluorescências:

Alvo	Fluoróforo
Dengue	FAM
IAC	HEX

Tabela 4 – Canais de detecção

7. Análise dos resultados

- Limite de detecção: 1.000 cópias/mL
- Sensibilidade: 95% para detecção de 1.000 cópias/mL
- Especificidade: 95% em relação a reatividade com outros vírus

8. Interpretação dos resultados

As amostras que apresentarem sinal de fluorescência, isto é, amplificação para o alvo no canal de fluorescência **FAM** 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** e amplificação para o alvo no canal de fluorescência **HEX** com Ct abaixo de 37 serão consideradas negativas para a detecção do respectivo alvo. O resultado do teste será considerado **NÃO DETECTADO OU NEGATIVO**

Alvo	Resultado Ct (Dengue)	Resultado Ct (IAC)	Interpretação
Dengue	< 37 (FAM)	+/-	Positivo para Dengue
Dengue	ND (FAM)	< 37 (HEX)	Negativo para Dengue
Dengue	ND (FAM)	ND (HEX)	Inválido*

Tabela 5 – Interpretação dos resultados

* O resultado do teste será considerado **INVALIDO** e o teste deverá ser repetido com uma nova amostra.

9. Garantia da Qualidade

A **NOVA BIOTECNOLOGIA** fornece garantia dos produtos por ela produzidos contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar da proposta.

- A garantia abrange defeitos de produção.
Exceções na garantia:
- Todos os produtos com defeitos oriundos de mau uso, imperícia, conservação ou armazenagem inadequada.
- Quando não for utilizado de acordo com sua finalidade de aplicação.

10. Informações do Fabricante

NOVA BIOTECNOLOGIA LTDA.

R. PASADENA, 235-PARQUE INDUSTRIAL SAN JOSE

NOVA BIOTECNOLOGIA LTDA.

R. PASADENA, 235-PARQUE INDUSTRIAL SAN JOSÉ, CEP: 06715.864-COTIA/SP - BRASIL

CEP: 06.715-864 - COTIA/SP - BRASIL

CNPJ: 24.096.423/0001-15

RESPONSÁVEL TÉCNICO

Dra. ELIZABETH CORTEZ HERRERA - CRBM 20951

11. Atendimento ao Consumidor

Tel: +55 (11) 4243-2356

www.novabiotecnologia.com.br

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