

**Conjunto de primers e sondas para detecção do  
vírus da Dengue/IAC – A M O S T R A  
DENG-IAC-20 – 20 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**

<b>Componentes</b>	<b>Conteúdo</b>	<b>Volume</b>
2X Master mix Dengue RT-qPCR	1 frasco/tampa transparente	200 µL
<i>Primers/Probe</i> Dengue-G-FAM	1 frasco/tampa âmbar	40 µL
<i>Primers/Probe</i> IAC-HEX	1 frasco/tampa âmbar	40 µL
Enzimas 1-Step RT-qPCR	1 frasco/tampa transparente	8 µL
IAC-Controle Int. Extração / Amplificação	1 frasco/tampa transparente	200 µL
Controle Positivo da reação	1 frasco transparente/tampa vermelha	50 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. 6.1.5  
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 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  
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](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)