

**Conjunto de primers e sondas para a detecção multiplex
do vírus Influenza A (H1N1) e RNase P
H1N1-RNASEP-100 - 100 reações – RUO
Ficha de Instruções de Uso**

1. Uso pretendido

O conjunto de primers e sondas **H1N1-RNASEP-100** é um teste *in vitro* para a detecção qualitativa dos vírus respiratório Influenza A (H1N1) em uma única reação, usando RNA extraído de amostras biológicas, por PCR em Tempo Real (RT-qPCR).

2. Características do Produto

O conjunto de *primers* e sonda para a detecção multiplex do vírus Influenza A (H1N1) é um sistema de amplificação que utiliza a técnica de PCR em tempo real. Esta técnica permite determinar a presença do alvo, através da amplificação de parte de seu material genético, ou seja, essa reação permite multiplicar determinada região do genoma de qualquer organismo em milhões de cópias. A sequência amplificada está marcada com sonda fluorescente (ROX), permitindo a medição e o registro da amplificação da reação pelo próprio software do equipamento. Como controle interno da reação, o conjunto apresenta *primers* e sonda marcada com o fluoróforo Cy5 para a RNaseP. Tampão de reação e enzimas apropriadas para amplificação do RNA.

2.1. Composição do Kit

Componentes	Conteúdo	Quantidade
2X RT-qPCR Reaction Mix	1000 µL	01
Enzyme RT-qPCR	100 µL	01
Primers e Probes INF A (H1N1) / RNaseP	400 µL	01
Controle Positivo	200 µL	01
Controle Negativo	200 µL	01

Tabela 1 -Insumos fornecidos no conjunto da reação

2.2. Especificações

A presença de uma sequência específica dos patógenos na reação de amplificação 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.

2.3 Equipamentos necessários, mas não fornecido

Termociclador para PCR em tempo real.

Nota: Importante trabalhar com equipamentos em boa condição de uso e com manutenções preventivas realizadas em dia.

3. Armazenamento e transporte

Os componentes fornecidos devem ser armazenados na embalagem original em temperatura controlada entre -15°C - 25°C (-20°C) e são estáveis até a data de vencimento indicada no rótulo. O produto é fornecido em embalagens com gelo seco que devem garantir uma temperatura de transporte abaixo -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 mais de nove vezes, pois pode reduzir a sensibilidade do ensaio. Recomenda-se realizar alíquotas dos reagentes de acordo com suas necessidades após o primeiro descongelamento.

4. Validade

O conjunto de primers e sondas para a detecção multiplex dos vírus INFA (H1N1) / RNase P tem validade de doze meses quando mantido armazenado corretamente.

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 perfurocortantes deve ser evitado. Além disso, todos devem ser treinados em procedimentos de biossegurança, como recomendado pela legislação em vigor.
- Não trocar os componentes entre diferentes lotes de insumos. Recomenda-se 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.
- 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.
- 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: ponteiras 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 a *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 e Controle Negativo em diferentes poços contendo a *mix* da reação.
- Homogeneizar 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 da *mix* e o início da leitura da reação no equipamento.

	1 reação
2X qPCR <i>Master Mix</i>	10 µL
<i>Primers e Probes</i> INFA (H1N1)/RNase P	4,0 µL
Enzima RT-qPCR	1 µL
Controle Positivo, Controle Negativo ou Amostra	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 20µL, um controle positivo e um negativo são necessários para cada ensaio, independentemente da quantidade de amostras processadas.
- O equipamento deve ser configurado em 3 etapas, conforme descrito na Tabela 3:

Observação³- desativar a opção “referência passiva” no equipamento.

Etapas	Temperaturas	Tempo	Ciclos
1	55°C	30 minutos	1
2	95°C	2 minutos	1
3	95°C 55°C	15 segundos 30 segundos	40

Tabela 3 – Programa de ciclagem

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

Alvo	Fluoróforo
Influenza A (H1N1)	ROX
RNaseP (Controle Endógeno)	Cy5

Tabela 4 – Canais de detecção

7. Análise dos resultados

- Limite de detecção: 2000 cópias/mL

- Sensibilidade: 100% para detecção de 2000 cópias/mL
- Especificidade: 95% em relação a reatividade com outros patógenos

8. Interpretação dos resultados

8.1. As amostras que apresentarem sinal de fluorescência, isto é, amplificação para o alvo no canal de fluorescência ROX com Ct igual ou abaixo de 35 serão consideradas positivas para a detecção do respectivo alvo.

O resultado do teste será considerado **DETECTADO OU POSITIVO**.

8.2. As amostras que **NÃO** apresentarem sinal de fluorescência, isto é, não amplificarem para o alvo no canal de fluorescência ROX e apresentarem um valor de Ct do controle endógeno (RNaseP) no canal de fluorescência CY5 entre 15 e 37, serão consideradas negativas para a detecção do respectivo alvo.

O resultado do teste será considerado **NÃO DETECTADO OU NEGATIVO**.

8.3. As amostras que **NÃO** apresentarem sinal de fluorescência, isto é, não amplificarem para o alvo no canal de fluorescência ROX e **NÃO** apresentarem um valor de Ct do controle endógeno (RNaseP) no canal de fluorescência Cy5, serão consideradas inválidas para a detecção do respectivo alvo.

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

Alvo - Valor de Ct	Alvo - Valor de Ct	Resultado
<i>Influenza A (H1N1)</i> (ROX)	RNaseP (Cy5)	
≤35	Detectado ou não detectado	Positivo
Não detectado	≤37	Negativo
>35CT<40	≤37	Inconclusivo*
Não detectado	>37	Inválido**

Tabela 5 – Interpretação dos resultados

*O resultado do teste será considerado **INCONCLUSIVO**. A amostra deverá ser reextraída e amplificada, caso apresente o mesmo resultado, o resultado poderá ser liberado como negativo ou solicitado uma nova coleta.

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

9. Garantia da Qualidade

A **NOVA BIOTECNOLOGIA** fornece garantia dos produtos por ela fornecidos 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: 06715-864 - 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.novabiotechologia.com.br

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