Conjunto de primers e sondas para a detecção multiplex dos vírus Influenza A, Influenza B, SARS-CoV-2 e RNaseP
INFABN1-RNASEP-20 - 20 reações – *RUO*
Ficha de Instruções de Uso

1. Uso pretendido

O conjunto de primers e sondas **INFABN1-RNASEP-20** é um teste *in vitro* para a detecção qualitativa dos vírus respiratórios Influenza A (H1N1 e H3N2), Influenza B e SARSCoV-2 (N1) 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 sondas para a detecção multiplex dos vírus Influenza A, B e SARSCoV-2 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. As sequencias amplificadas estão marcadas com sondas fluorescentes (FAM, HEX, 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 sondas marcaods 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	250 µL	01
Enzyme RT-qPCR	20 µL	01
Primers e Probes INF A/INF B/N1/RNaseP	80 µL	01
Água ultrapura	50 µL	01
Controle Positivo 1 (INFA)	50 µL	01
Controle Positivo 2 (INFB)	50 µL	01
Controle Positivo 3 (N1)	50 µL	01
Controle Negativo	50 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/INFB/N1/RNaseP 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 20µL 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 1, Controle Positivo 2 e Controle positivo 3 em diferentes poços contendo a mix da reação.
- Homogeneizar com auxílio de uma pipeta.
- Levar ao equipamento para a leitura.

*Observação[1] - Todo o procedimento deve ser feito com os tubos em gelo.
*Observação[2] - Não deve ser ultrapassado 30 minutos entre o preparo da *mix* e o início da leitura da reação no equipamento.

	1 reação
2X qPCR *Master Mix*	12,5 µL
Primers e *Probes* INFA/INFB/N1/RNAse P	4,0 µL
Enzima RT-qPCR	1 µL
Água ultrapura	2,5 µL
Controles Positivos ou Amostra	5,0 uL
Volume final de reação	25,0 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 25µL, três controles positivos 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:

Observação[3]- 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 e H3N2)	**HEX ou VIC**
Influenza B	**ROX**
SARCoV-2 (N1)	**FAM**
RNaseP (Controle Endógeno)	**Cy5**

Tabela 4 – Canais de detecção

7. Análise dos resultados

- Limite de detecção: 250 cópias/mL
- Sensibilidade: 100% para detecção de 250 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 HEX/VIC, FAM ou ROX com Ct igual ou abaixo de 37 serão consideradas positivas para a detecção do respectivo alvo do painel respiratório.

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 HEX/VIC, FAM ou 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 do painel respiratório.

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 HEX/VIC, FAM ou 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**	**Alvo - Valor de Ct**	**Alvo - Valor de Ct**	**Resultado**
***Influenza* A (HEX)**	***Influenza B* (ROX)**	**SARCoV-2 (FAM)**	**RNAseP (Cy5)**	
<37	<37	<37	Detectado ou não detectado	Positivo para *Influenza* A, *Influenza* B e SARCoV-2
<37	Não detectado	Não detectado	Detectado ou não detectado	Positivo para *Influenza* A
Não detectado	<37	Não detectado	Detectado ou não detectado	Positivo para *Influenza* B
Não detectado	Não detectado	<37	Detectado ou não detectado	Positivo para SARCoV-2
Não detectado	Não detectado	Não detectado	<37	Negativo para *Influenza* A, *Influenza* B e SARCoV-2
Não detectado	Não detectado	Não detectado	>37	Inválido*

Tabela 5 – Interpretação dos resultados

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