

**Conjunto de primers e sondas para detecção de *Mycoplasma genitalium*,
Mycoplasma hominis e RNASEP
GENH-RNASEP-100 – 100 reações
Ficha de Instruções de Uso**

1. Uso pretendido

O conjunto de *primers* e sondas **GENH-RNASEP-100** é um teste *in vitro* para a detecção qualitativa do ácido nucléico de *Mycoplasma genitalium/hominis* em amostras humanas (escovado cervical, raspado uretral, urina de mulheres e homens), como auxílio para a avaliação das infecções por estes microrganismos.

2. Características do Produto

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 de *Mycoplasma genitalium* e sonda fluorescente marcada com HEX na extremidade 5' e NFQ (*non-fluorescent quencher*) na extremidade 3' possuindo 100% de homologia com as sequências de *Mycoplasma hominis*. No Controle interno da reação, o conjunto apresenta *primers* e sonda marcada com o fluoróforo Cy5 para a RNaseP. Tampão de reação e enzima apropriada para a amplificação do DNA.

2.1. Composição do conjunto

Componentes	Conteúdo	Volume
2X PCR Master Mix	1 frasco/tampa transparente	1 mL
<i>Primers/Probes Mycoplasma genitalium/hominis</i> (FAM/HEX)	1 frasco/tampa âmbar	200 µL
<i>Primers/Probe RNaseP</i> (Cy5)	1 frasco/tampa âmbar	200 µL
Enzima <i>Taq</i> DNA polimerase	1 frasco/tampa transparente	20 µL
Controle Positivo da reação	1 frasco transparente/tampa vermelha	200 µL
Água ultrapura	2 frascos/tampa transparente	1,5 mL

Tabela 1 – Insumos fornecidos no conjunto da reação

2.2. Especificações

A presença de sequências específicas dos patógenos na reação de amplificação é detectada por um aumento na fluorescência observada a partir das sondas correspondentes duplamente marcadas, e é relatado como o valor de *threshold* de ciclo (Ct) pelo termociclador em Tempo Real.

2.3. Equipamento necessário, mas não fornecido

Termociclador para PCR em tempo real.

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

3. Armazenamento e transporte

Os componentes fornecidos devem ser armazenados na embalagem original em temperatura controlada de -15°C a -25°C (-20°C) e 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 . Congelar o produto imediatamente após o uso. Deve ser evitado o congelamento e o descongelamento excessivo dos reagentes, 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 de *Mycoplasma genitalium* e *Mycoplasma hominis* tem validade de doze meses quando mantido armazenado corretamente.

5. Informação de Segurança

5.1. Os insumos devem ser utilizados somente por pessoal técnico qualificado e devidamente treinado.

5.2. 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.

5.3. 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.

5.4. 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.

5.5. 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.

5.6. Evitar contaminação cruzada das amostras utilizando ponteiras descartáveis e trocando-as após a aplicação de cada amostra.

5.7. Evitar contaminação cruzada entre os reagentes utilizando ponteiras descartáveis e trocando-as entre o uso de cada uma.

5.8. Não utilizar os insumos fornecidos após a data de validade apresentada na etiqueta externa.

5.9. 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.

5.11. Realizar os procedimentos o mais rápido possível, mantendo os componentes no gelo ou em reservatório refrigerado.

5.12. 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.

5.13. 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.

5.14. 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.

5.15. Os respingos provocados acidentalmente durante o manuseio das amostras devem ser absorvidos por lenços de papel umedecidos com hipoclorito, e em seguida, com água.

5.16. 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)

- 6.1.1. Preparar a *Mix* da reação, conforme a Tabela 2, em tubo de 1,5 mL.
- 6.1.2. Adicionar 15µL da *Mix* da reação em tubos de 0,2mL ou placas, de acordo com o equipamento.
- 6.1.3. Adicionar 5µL da amostra ao poço contendo a mix da reação.
- 6.1.4. Adicionar 5µL do Controle Positivo em um diferente poço contendo a mix da reação.
- 6.1.5. Homogeneizar com auxílio de uma pipeta.
- 6.1.6. 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 qPCR Master Mix	10,0 µL
Primers e Probes <i>M. genitalium</i> / <i>M. hominis</i>	2,0 µL
Primers e Probes RNaseP	2,0 µL
Enzima Taq DNA Polimerase	0,2 µL
Água	0,8 µL
Controle Positivo 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 (água) são necessários para cada ensaio, independentemente da quantidade de amostras processadas.

O equipamento deve ser configurado em 2 etapas, conforme descrito na Tabela 3:

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

Etapas	Temperaturas	Tempo	Ciclos
1	95°C	2 minutos	1
2	95°C 56°C	15 segundos 30 segundos	40

	72°C	30 segundos	
--	------	-------------	--

Tabela 3 – Programa de ciclagem

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

Alvo	Fluoróforo
<i>Mycoplasma genitalium</i>	FAM
<i>Mycoplasma hominis</i>	HEX
RNAseP	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: 99% 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 FAM ou HEX com Ct igual ou abaixo de 37 serão consideradas positivas para a detecção dos respectivos alvos.

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 FAM ou HEX 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 FAM 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.

Alvo - Valor de Ct	Alvo - Valor de Ct	Alvo - Valor de Ct	Resultado
<i>Mycoplasma genitalium</i> (FAM)	<i>Mycoplasma hominis</i> (HEX)	RNAseP (Cy5)	
<37	Não detectado	Detectado ou não detectado	Positivo para <i>M. genitalium</i>

Não detectado	<37	Detectado ou não detectado	Positivo para <i>M. hominis</i>
>37 CT <40	>37 CT <40	<37	Inconclusivo*
Não detectado	Não detectado	<37	Negativo
Não detectado	Não detectado	>37	Inválido**

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

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

Tabela 5 – Interpretação dos resultados

9. Garantia da Qualidade

A **NOVA BIOTECNOLOGIA** fornece garantia dos produtos por ela revendidos 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 20951/1

11. Atendimento ao Consumidor

Tel: +55 (11) 4243-2356

www.novabiotecnologia.com.br

e-mail: assessoria@novabiotecnologia.com.br