Conjunto de primers e sondas para detecção multiplex de *Treponema pallidum* e RNASEP
TPALL-RNASEP-100 – 100 reações - RUO
Ficha de Instruções de Uso

1. Uso pretendido

O conjunto de *primers* e sondas **TPALL-RNASEP-100** é um teste *in vitro* para a detecção qualitativa do ácido nucléico de *Treponema pallidum* em amostras humanas (escovado cervical, raspado uretral, urina de mulheres e homens), como auxílio para a avaliação das infeções 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 *Treponema pallidum*. 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
Primers/Probes T. pallidum (FAM)	1 frasco/tampa âmbar	200 µL
Primers/Probe RNAseP (Cy5)	1 frasco/tampa âmbar	200 µL
Enzima *Taq* 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 uma sequência específica do patógeno na reação de amplificação é detectada por um aumento na fluorescência observada a partir da sonda correspondente duplamente marcada, 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 entre -15°C e -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 o 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 sonda para a detecção de *Treponema pallidum* 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 em um diferente poço 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*	10,0 µL
Primers e *Probes Treponema pallidum*-FAM	2,0 µL
Primers e *Probes* RNAseP-Cy5	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:
*Observação[3]- desativar a opção “referência passiva” no equipamento.

Etapas	Temperaturas	Tempo	Ciclos
1	95°C	2 minutos	1
2	95°C 56°C 72°C	15 segundos 30 segundos 30 segundos	40

Tabela 3 – Programa de ciclagem

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

Alvo	**Fluoróforo**
Treponema pallidum	**FAM**
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 com Ct igual ou abaixo de 37 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 FAM 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**	**Resultado**
***T. pallidum* (FAM)**	**RNAseP (Cy5)**	
<37	Detectado ou não detectado	Positivo
Não detectado	<37	Negativo
Não detectado	>37	Inválido*

* 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 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: 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