

BioAmp *Lawsonia intracellularis*

Referência: BRA0019R025

Teste para detecção de *Lawsonia intracellularis* por PCR em Tempo Real (qPCR)
25 reações

O kit *Lawsonia intracellularis* é um sistema sensível e específico que contém todos os reagentes necessários para a detecção e quantificação específica de DNA de *Lawsonia intracellularis* em amostras biológicas. A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real (qPCR) se baseia na amplificação de regiões específicas do genoma de um patógeno. Na qPCR, o produto amplificado é identificado mediante marcadores de fluorescência, os quais estão ligados às sondas oligonucleotídicas que se ligam especificamente à sequência alvo.

Composição do Kit

Componente	Composição	Quantidade
Master Mix BioAmp	Mistura otimizada de água livre de nucleases, tampão, dNTPs, enzima Taq polimerase, oligonucleotídeos e sondas de hidrólise específicos para o agente alvo e para o controle interno exógeno.	1 tubo*
Controle Negativo (CN)	Água livre de nucleases	1 tubo

*O tubo corresponde a 25 reações.

Condições de Armazenamento

- Este produto é transportado sob refrigeração, não afetando o desempenho do produto.
- Mantenha o reagente congelado entre -15°C e -30°C até o uso.
- Evite ciclos repetidos de congelamento/descongelamento (>2 vezes) para garantir a estabilidade do kit.

Informações de segurança

- Quando trabalhar com produtos químicos use jaleco, luvas e óculos de proteção adequados. Para obter mais informações, consulte os documentos sobre segurança (*Safety Data Sheet*, SDS) correspondentes.
- Todos os resíduos de amostra e os objetos que estiveram em contato com os mesmos devem ser descontaminados ou eliminados como material potencialmente infeccioso.

Equipamentos e insumos que devem ser fornecidos pelo usuário

- Equipamentos:** Termociclador para PCR em Tempo Real com filtros para leitura dos fluoróforos FAM™ e HEX™ ou similar, Cabine para PCR, micropipetas calibradas de volume variável (0,5µL a 1000µL), centrífuga de tubos, homogeneizador de tubos tipo vortex e raque para microtubos.

- Insumos:** Kit de extração de ácidos nucleicos, ponteiras com barreira, microtubos para PCR em Tempo Real e luvas de procedimento sem talco.

Avisos e precauções

- Uso exclusivo para diagnóstico *in vitro*.
- Não utilizar se a embalagem estiver danificada.
- Evitar a exposição à luz.
- Não utilizar o reagente após a data de validade.
- Não abrir os tubos de PCR após a amplificação.
- Não misturar os reagentes de diferentes lotes.
- Utilizar plásticos livres de nucleases.
- Todas as instruções devem ser lidas antes de realizar o teste e estritamente seguidas.

Suporte técnico

Para maiores informações e assistência técnica, entre em contato com o Suporte Técnico pelo e-mail biorise@biorise.com.br, site biorise.com.br ou telefone (45) 99858-0038.

Histórico de revisões

Manual de uso	Data	Versão	Modificações
MU-LW0002	04/2024	V01	Primeira versão

Nota: pequenas alterações tipográficas, gramaticais e de formatação não são incluídas no histórico de revisões.

Biorise Biotecnologia
DNA SOLUCOES BIOMOLECULARES LTDA
CNPJ 52.438.916/0001-21
Rua Laranjeiras do Sul, 391, Bairro São Cristóvão
Cascavel - PR - Brasil, CEP: 85816-520
Fone: (45) 99858-0038
biorise@biorise.com.br | biorise.com.br

Procedimento de Uso

A. Extração de ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos (DNA/RNA) devem ser extraídos da amostra e purificados antes do uso do *kit* de PCR. Os *kits* de extração de ácidos nucleicos listados abaixo são recomendados:

Nome do produto	Sistema de extração	Referência
-----------------	---------------------	------------

BioFast <i>Kit</i> de Extração rápida de DNA	Lise direta	100 mL: Ref: BRF01R100
--	-------------	------------------------

Para a extração consulte o Manual de Uso do *kit* de interesse, disponível no site.

Outros *kits* de extração de ácidos nucleicos podem ser utilizados se previamente validados pelo usuário.

Após a extração, os ácidos nucleicos podem ser mantidos em gelo ou de +2°C a +8°C por algumas horas até o uso. Para longos períodos de armazenamento, manter as amostras em temperatura entre -15°C e -65°C.

B. Preparo da Reação

Antes de começar

- Descongele todos os reagentes em temperatura ambiente e protegidos da luz.
- Antes de utilizar, homogeneíze e centrifugue todos os reagentes.
- Conserve os reagentes em gelo ou em um bloco frio durante o preparo da reação de PCR.

1. Pipete 21 µL do Master Mix BioAmp em cada tubo de reação.

Componente	1 reação
Master Mix BioAmp	21 µL
Amostra	4 µL
Volume total	25 µL

2. Adicione 4 µL da amostra em cada tubo de reação.
3. Adicione 4 µL de BioRef *Lawsonia intracellularis* (Ref: BRR0021) ao tubo de reação dedicado ao controle positivo de amplificação.
4. Adicione 4 µL do CN fornecido no *kit* ao tubo de reação dedicado ao controle negativo da amplificação.
5. Feche os tubos de reação com tampas correspondentes ou sele a placa.
6. Defina os filtros para os marcadores indicados no *software* do termociclador de acordo com a tabela abaixo.

Patógeno/Controle Interno	Reporter	Quencher
<i>Lawsonia intracellularis</i>	FAM™	BHQ-1
Referência passiva ¹	ROX™	

¹Referência passiva para uso com instrumentos de PCR em tempo real que permitem normalização.

7. Execute a corrida no termociclador de acordo com as condições especificadas na tabela abaixo.

Número de Ciclos	Temperatura	Tempo
1x	95 °C	2 minutos
40x	95 °C	15 segundos
	60 °C 	20 segundos

 Captura da fluorescência.

C. Análise e interpretação dos resultados

1. Determinar o *Threshold* em qualquer ponto da fase exponencial do gráfico de amplificação de cada fluorocromo.
2. As etapas de extração e amplificação são validadas se os seguintes resultados são obtidos:

Controles	Amplificação	Interpretação
	FAM™	
Controle negativo de amplificação (CNA)	× Não	Ausência de contaminação na amplificação
Controle positivo de amplificação (CPA)	✓ Sim	Validação do passo de amplificação
Controle negativo de extração (CNE)	× Não	Ausência de contaminação na extração
Controle positivo de extração (CPE)	✓ Sim	Validação do passo de extração

3. A reação de amplificação de cada amostra é validada se pelo menos uma curva de amplificação é observada nos canais FAM™ e/ou HEX™ ou equivalente.

Amplificação	Interpretação
FAM™	
× Não	Não detectado ¹
✓ Sim	Detectado
	Inconclusivo ²

¹**Não detectado:** Ausência do material genético do patógeno na amostra ou em quantidades inferiores ao limite de detecção.

²**Inconclusivo:** curva de amplificação não característica.

Possíveis causas: Reação de PCR defeituosa devido a inibidores, erro de configuração, amostra degradada e/ou problema com extração de ácidos nucleicos (perda ou degradação dos ácidos nucleicos).

Recomendações: Realizar uma nova reação de PCR utilizando a amostra diluída 1:5 em água ultrapura. Se a reação for inconclusiva, realizar uma nova extração dos ácidos nucleicos da amostra.

Observação: amostras que apresentarem amplificação do marcador FAM™ com *Ct* (*cycle threshold*) acima de 37 devem ter seu resultado considerado como negativo, devido ao limite de detecção da técnica.