

BioAmp APEC

BRA0052R100 e BRA0052R25

Teste para detecção de genes de virulência de Escherichia coli aviária patogênica (APEC) por qPCR 100/25 reações

O kit BioAmp APEC Virulência é um sistema sensível e específico que contém todos os reagentes necessários para a detecção e quantificação dos principais genes de virulência associados à Escherichia coli aviária patogênica (APEC), incluindo os genes iss, iutA, hlyF, ompT e iron, em amostras biológicas ou isolados bacterianos.

Composição do Kit

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

*Cada 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.
- Não congelar o Master Mix após a adição da enzima RT.
- 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, site biorise@biorise.com.br ou telefone (45) 99858-0038

Histórico de revisões

Manual de uso	Data	Versão	Modificações
MU-APCE0001	07/ 2025	V1	-

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

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 utilizados devem ser 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. Fracione cada Master Mix BioAmp (hlyF-ompT/ iutA-iron/iss) de acordo com o número de reações a serem preparadas

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

2. Homogeneíze a mistura e pipete 21uL do Master Mix BioAmp em cada tubo de reação.

3. Adicione 4 µL da amostra em cada tubo de reação.

4. Adicione 4 µL de BioRef APEC (Ref: BRRO052) ao tubo de reação dedicado ao controle positivo de amplificação.

5. Adicione 4 uL de CN fornecido no *kit* ao tubo de reação dedicado ao controle negativo da amplificação.

6. Feche os tubos de reação com tampas correspondentes ou sele a placa.

7. Defina os filtros para os marcadores indicados no *software* o termociclador de acordo com a tabela abaixo.

Alvo	Reporter	Quencher
<i>hlyF-ompT</i>	FAM™ - HEX ou similar	BHQ-1
<i>iutA-iron</i>	FAM™ - HEX ou similar	BHQ-1
iss	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 ¹ 	1 minuto

¹  Captura da fluorescência.

C. Análise e interpretação dos resultados

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

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

3. A reação de amplificação de cada amostra é interpretada de acordo com a tabela abaixo

Mix	Amplificação		Interpretação
	FAM™	HEX™ / similar	
Mix hlyF-ompT	Sim	Sim	hlyF e ompT
	Não	Sim	ompT
	Sim	Não	hlyF
	Não	Não	¹ Não detectado hlyF nem ompT
Mix iron-iutA	Sim	Sim	iron e iutA
	Não	Sim	iutA
	Sim	Não	iron
	Não	Não	¹ Não detectado hlyF nem ompT
Mix iss	sim	-	iss
	Não	-	¹ Não detectado

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

Observação amostras que apresentarem amplificação dos marcadores FAM™ e HEX™ ou similar com Ct (cycle threshold) acima de 37 devem ter seu resultado considerado como negativo, devido ao limite de detecção da técnica.