

## BioAmp *Avibacterium paragallinarum*

Referência: BRA0029R100

Teste para detecção de *Avibacterium paragallinarum* por PCR em Tempo Real (qPCR)  
100 reações

O kit BioAmp *Avibacterium paragallinarum* é um sistema sensível e específico que contém todos os reagentes necessários para a detecção específica de DNA de *Avibacterium paragallinarum* 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. | 4 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.
- 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](mailto:biorise@biorise.com.br), site [biorise.com.br](http://biorise.com.br) ou telefone (45) 99858-0038.

### Histórico de revisões

| Manual de uso | Data    | Versão | Modificações          |
|---------------|---------|--------|-----------------------|
| MU-AVI0001    | 02/2024 | V01    | Primeira versão       |
| MU-AVI0001    | 03/2025 | V02    | 20seg – 1 minuto      |
| MU-AVI0001    | 01/2026 | V03    | Alteração de endereço |

*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, sala 01, São Cristóvão,  
Cascavel-PR – Brasil, CEP: 85.816-520  
Fone: (45) 99858-0038  
[biorise@biorise.com.br](mailto:biorise@biorise.com.br) | [biorise.com.br](http://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 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. Pipete 21 µL do Master Mix BioAmp em cada tubo de reação.

| Componente          | 1 reação     |
|---------------------|--------------|
| Master Mix BioAmp   | 21 µL        |
| Amostra             | 4 µL         |
| <b>Volume total</b> | <b>25 µL</b> |

2. Adicione 4 µL da amostra em cada tubo de reação.
3. Adicione 4 µL de BioRef *Avibacterium paragallinarum* (AVI) (Ref: BRR0029) 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>Avibacterium paragallinarum</i> | FAM™     | BHQ-1    |
| Referência passiva <sup>1</sup>    | ROX™     |          |

<sup>1</sup>Referência 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 minuto    |

 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<br>FAM™ | Interpretação                            |
|-----------------------------------------|----------------------|------------------------------------------|
| 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 interpretada de acordo com a tabela abaixo.

| Amplificação<br>FAM™ | Interpretação              |
|----------------------|----------------------------|
| × Não                | Não detectado <sup>1</sup> |
| ✓ Sim                | Detectado                  |
|                      | Inconclusivo <sup>2</sup>  |

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

<sup>2</sup>**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.