

BioAmp Reovírus aviário

Referência: BRA0014R100

Teste para detecção do Reovírus aviário por Transcrição Reversa seguida de PCR em Tempo Real (RT-qPCR)
100 reações

O kit BioAmp Reovírus aviário é um sistema sensível e específico que contém todos os reagentes necessários para a detecção e quantificação específica de RNA do Reovírus aviário em amostras biológicas. A técnica de Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) se baseia na amplificação de regiões específicas do genoma de um patógeno. Na RT-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*
RT	Enzima Transcriptase Reversa	1 tubo
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 biorise@biorise.com.br, site biorise.com.br ou telefone (45) 99858-0038.

Histórico de revisões

Manual de uso	Data	Versão	Modificações
MU-REO0001	03/2024	V01	Primeira versão
MU-REO0001	03/2025	V02	20seg - 1 minuto
MU-REO0001	01/2026	V03	Alteração de endereço

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

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. Fracione o Master Mix BioAmp de acordo com o número de reações a serem preparadas¹ e inclua o volume correspondente de enzima RT conforme a tabela abaixo.

¹Não é recomendado o preparo de menos de 3 reações devido à perda de volume e possíveis erros de pipetagem.

Componente	1 reação
Master Mix BioAmp	20,6 µL
RT	0,4 µL
Amostra	4 µL
Volume total por reação	25 µL

2. Homogeneíze a mistura e pipete 21 µL do Master Mix BioAmp com RT em cada tubo de reação.
3. Adicione 4 µL da amostra em cada tubo de reação.
4. Adicione 4 µL de BioRef Reovírus aviário (Ref: BRR0014) ao tubo de reação dedicado ao controle positivo de amplificação.
5. Adicione 4 µL do 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* do termociclador de acordo com a tabela abaixo.

Patógeno/Controle Interno	Reporter	Quencher
Reovírus aviário	FAM™	BHQ-1
Referência passiva ¹	ROX™	

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

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

Número de Ciclos	Temperatura	Tempo
1x	45 °C	15 minutos
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 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 FAM™	Interpretação
× 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.