

BioAmp *Salmonella spp.*

Referência: BRA0001R100

Teste para detecção de *Salmonella spp.* por PCR em Tempo Real (qPCR)
100 reações

O kit BioAmp *Salmonella spp.* é um sistema sensível e específico que contém todos os reagentes necessários para a detecção e quantificação específica de DNA de *Salmonella spp.* (gene *InvA*) 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. Este kit inclui no Master Mix um Controle Interno Exógeno (CIE) que controla a integridade da reação e ainda exclui a possibilidade de resultados falsos negativos decorrentes substâncias inibidoras presentes na amostra.

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.	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, ponteiros 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-SS0001	03/2025	V02	20 para 60seg
MU-SS0001	01/2026	V03	Alteração do 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. 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 por reação	25 µL

2. Adicione 4 µL da amostra em cada tubo de reação.
3. Adicione 4 µL de BioRef *Salmonella spp.* (Ref: BRR0001) 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>Salmonella spp.</i>	FAM™	BHQ-1
Controle Interno Exógeno (CIE)	HEX™ ou equivalente	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 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		Interpretação
	FAM™	HEX™ ou equivalente	
Controle negativo de amplificação (CNA)	× Não	✓ Sim	Ausência de contaminação na amplificação
Controle positivo de amplificação (CPA)	✓ Sim	✓ × Sim/Não ¹	Validação do passo de amplificação
Controle negativo de extração (CNE)	× Não	✓ Sim	Ausência de contaminação na extração
Controle positivo de extração (CPE)	✓ Sim	✓ × Sim/Não ¹	Validação do passo de extração

¹A ausência de amplificação do controle interno (canal HEX™ ou equivalente) em amostras positivas com concentração elevada não invalida a reação.

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™	HEX™ ou equivalente	
× Não	✓ Sim	Não detectado ¹
✓ Sim	✓ Sim	Detectado
✓ Sim	× Não	Detectado
× Não	× Não	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 dos marcadores FAM™ e HEX™ ou equivalente com *Ct* (cycle threshold) acima de 37 devem ter seu resultado considerado como negativo,