

Teste para a detecção quantitativa do RNA do vírus da Dengue através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

ATENÇÃO: Antes de iniciar o teste, observar o item "CUIDADOS ESPECIAIS" na Instrução de Uso do produto.

PREPARO DAS AMOSTRAS

Os ácidos nucleicos (RNA) das amostras devem ser extraídos seguindo as instruções de uso do kit escolhido. O Controle Interno (R5) deve ser preparado e adicionado às amostras durante a extração.

- Adicionar 4µL do **Controle Interno (R5)** a cada tubo contendo as amostras já ressuspensas em tampão de extração/lise. Completar a extração de acordo com as instruções do Kit.

OBS: Nunca adicionar o Controle Interno diretamente à amostra biológica pura, pois pode resultar em degradação do mesmo.

PREPARO DOS REAGENTES*

*Após a ressuspensão dos reagentes o produto é estável por 6 meses.

A Preparo dos reagentes

1. Centrifugar (pulso *spin*) os reagentes: **Solução PCR (R1)**, **Solução PCR CI (R4)**, **Controle Interno (R5)** e **Padrão A (R7)** antes da abertura dos microtubos.
2. Ressuspender cada frasco de **Mix Taq (R2)**** com 525µL do reagente **Tampão Mix (R3)**.
3. Ressuspender os reagentes, **Solução PCR (R1)** e **Solução PCR CI (R4)** com o reagente **Água (R9)** de acordo com a tabela abaixo:

REAGENTE	APRESENTAÇÃO	
	50 Testes	150 Testes
Solução PCR (R1)	55 µL	165 µL
Solução PCR CI (R4)	55 µL	165 µL

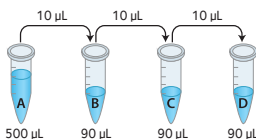
4. Ressuspender os reagentes, **Controle Interno (R5)** e **Padrão A (R7)** com o reagente **Diluyente (R8)** de acordo com a tabela abaixo:

REAGENTE	APRESENTAÇÃO	
	50 Testes	150 Testes
Controle Interno (R5)	600 µL	600 µL
Padrão A (R7)	500 µL	500 µL

**Mix Taq (R2) não contém fluoróforo de referência passiva (ROX).

B Diluição do Padrão Quantitativo

1. Separar 3 microtubos (não fornecido no kit) adequados para a diluição seriada do **Padrão A (R7)** já ressuspendido.
2. Pipetar 90µL do **Diluyente (R8)** em cada microtubo e nomeá-los como B, C e D respectivamente.
3. Em seguida, pipetar 10µL do **Padrão A (R7)** no microtubo B e homogeneizar.
4. Trocar a ponteira e pipetar 10µL do microtubo B no microtubo C e homogeneizar.
5. Trocar a ponteira e pipetar 10µL do microtubo C no microtubo D e homogeneizar.



PREPARO DA REAÇÃO DA PCR

1. Determinar o mapa das amostras, separar previamente os microtubos/poços a serem utilizados de acordo com o número de reações.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Padrão A	Padrão D						
B	Padrão A	Padrão D						
C	Padrão B	CN						
D	Padrão B	CN						
E	Padrão C	1						
F	Padrão C	2						

2. Preparar o volume da solução de PCR final de acordo com o número de reações necessárias (incluindo amostras, Controle e Padrões Quantitativos).

REAGENTE	1 REAÇÃO	25 REAÇÕES	50 REAÇÕES	100 REAÇÕES
Mix Taq (R2)	10 µL	250 µL	500 µL	1mL
Solução PCR (R1)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Solução PCR CI (R4)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Água (R9)	3 µL	75 µL	150 µL	300 µL

3. Pipetar 15µL da solução de PCR final nos tubos ou poços determinados para as reações.

4. Adicionar 5µL do RNA extraído das amostras ou 5µL dos Padrões Quantitativos ou 5µL do Controle Negativo (R6) nos microtubos/poços previamente determinadas.

5. Transportar os microtubos/placa para o equipamento de PCR em Tempo Real.

PROGRAMAÇÃO DA PCR

TESTE QUANTITATIVO - Padrões Quantitativos

A- 2×10^5 cópias / µL **B-** 2×10^4 cópias / µL **C-** 2×10^3 cópias / µL **D-** 2×10^2 cópias / µL

Detectores (sondas)

Alvo	Detector	Quencher
Dengue	FAM	NFQ-MGB
Controle Interno	VIC	

Ciclos de Temperatura

	TEMPERATURA	TEMPO	CICLOS
1	55°C	10 Minutos	1
2	95°C	2 Minutos	1
3	95°C	10 Segundos	50
	60°C	60 Segundos	

VALIDAÇÃO

Curva Padrão

Coefficiente de correlação (R^2): $0,99 \leq R^2 \leq 1,00$

CT Controle Negativo

FAM	VIC	Resultado	Amplificação/Deteção
Indeterminado	Indeterminado	Negativo	Válida

Amostra

FAM	VIC	Resultado	Deteção
Concentração determinada	$25 \leq CT \leq 31$	Positivo	Válida
	$CT < 25$ ou $CT > 31$	Positivo	Inválido*
Concentração indeterminada	$25 \leq CT \leq 31$	Negativo	Válida
	$CT < 25$ ou $CT > 31$	Negativo	Inválido*

*Vide Instruções de Uso, item **F. Validação do Resultado** e subitem **3. Amostras**.

Revisão: Junho/2018