

Teste para a detecção quantitativa do DNA de *Papilomavírus humano tipo 16* 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 nucléicos (DNA) 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.

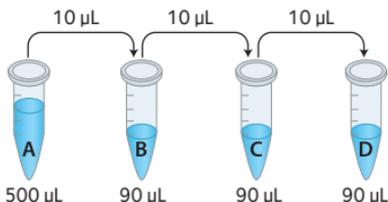
A Preparo dos reagentes

1. Centrifugar (pulso *spin*) os reagentes: **Solução de PCR (R1)**, **Solução de PCR CI (R4)**, **Controle Interno (R5)** e **Padrão A (R7)** antes da abertura dos microtubos.
2. Ressuspender o reagente **Mix taq (R2)** com 525μL do reagente **Tampão Mix (R3)**.
3. Ressuspender os reagentes, **Solução de PCR (R1)**, **Solução de PCR CI (R4)**, **Controle Interno (R5)** e **Padrão A (R7)**, com o reagente **Água (R8)** de acordo com a tabela abaixo:

REAGENTE	APRESENTAÇÃO
Solução PCR (R1)	55 μL
Solução PCR CI (R4)	55 μL
Controle Interno (R5)	600 μL

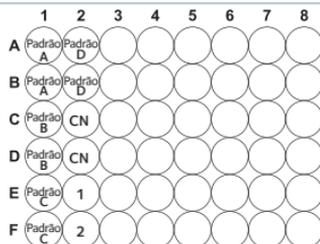
B Diluição do padrão quantitativo

1. Ressuspender o **Padrão A (R7)** com 500μL do **Diluyente (R8)**.
2. Separar 3 microtubos (não fornecido no kit) adequados para a diluição seriada do **Padrão A (R7)**.
3. Pipetar 90μL do **Diluyente (R8)** em cada microtubo e nomeá-los como B, C e D respectivamente.
4. Em seguida, pipetar 10μL do **Padrão A (R7)** no microtubo B e homogeneizar.
5. Trocar a ponteira e pipetar 10μL do microtubo B no microtubo C e homogeneizar.
6. 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 necessárias.



2. Para cada amostra, controle e padrão quantitativo preparar a solução final de PCR com:

- 10 μ L de Mix Taq (R2 fornecido no kit).
- 1 μ L de Solução PCR (R1 fornecido no kit).
- 1 μ L de Solução PCR CI (R4 fornecido no kit).
- 3 μ L de água (R9 fornecido no kit).



3. Adicionar 5 μ L do DNA extraído das amostras (concentração sugerida 5ng/ μ L) ou 5 μ L dos padrões quantitativos ou 5 μ L do controle negativo nos microtubos/poços previamente determinadas.

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

PROGRAMAÇÃO DA PCR

TESTE QUANTITATIVO - Padrões Quantitativos

A- 2 x 10⁵ cópias / μ L **B-** 2 x 10⁴ cópias / μ L **C-** 2 x 10³ cópias / μ L **D-** 2 x 10² cópias / μ L

Detectores (sondas)

Detector HPV Alto Risco:	Detector HPV Alto Risco:
"reporter 1" = FAM	"reporter 2" = VIC

Ciclos de Temperatura

	TEMPERATURA	TEMPO	CICLOS
1	95°C	15 Minutos	1
2	95°C	10 Segundos	50
	60°C	60 Segundos	

VALIDAÇÃO

Curva Padrão

Coefficiente de correlação (R²): 0,99 \leq R² \leq 1,00

CT Controle Negativo

FAM	VIC	Resultado	Amplificação/Deteccão
Indeterminado	Indeterminado	Negativo	Válida

Amostra

FAM	VIC	Resultado	Deteccão
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: Maio/2015