

Teste para a detecção quantitativa do DNA de *Ureaplasma urealyticum* 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 (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.*

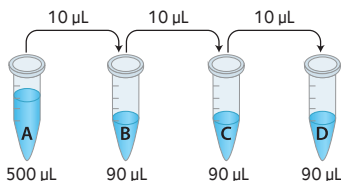
A Preparo dos reagentes

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) e Controle Interno (R5) com o reagente Água (R8) de acordo com a tabela abaixo:

REAGENTE	VOLUME DE ÁGUA (R9)
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 Diluente (R8).
2. Separar 3 microtubos (não fornecido no kit) adequados para a diluição seriada do Padrão A (R7).
3. Pipetar 90µL do Diluente (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.

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

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



3. Adicionar 5µL do DNA extraído das amostras (concentração sugerida 5ng/µL) ou 5µL dos padrões quantitativos ou 5µL 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- 2×10^5 cópias / µL **B**- 2×10^4 cópias / µL **C**- 2×10^3 cópias / µL **D**- 2×10^2 cópias / µL

Detectores (sondas)

Detector Ureaplasma ur:	Detector Controle Interno
"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 (R^2): $0,99 \leq R^2 \leq 1,00$

CT Controle Negativo

FAM	VIC	Resultado	Amplificação/Detecção
Indeterminado	Indeterminado	Negativo	Válida

Amostra

FAM	VIC	Resultado	Detecção
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