

BioAmp *Mycoplasma gallisepticum*

Referência: BRA0005R100

Teste para detecção de *Mycoplasma gallisepticum* por PCR em Tempo Real (qPCR)
100 reações

O kit BioAmp *Mycoplasma gallisepticum* é um sistema sensível e específico que contém todos os reagentes necessários para a detecção e quantificação específica de DNA de *Mycoplasma gallisepticum* 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, 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.
- ❑ 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-MG0001 | 03/2025 | V02 | 20 para 60seg |

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 *Mycoplasma gallisepticum* (Ref: BRR0005) 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>Mycoplasma gallisepticum</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.

| FAM™ | Amplificação | | Interpretação |
|-------|---------------------|--|----------------------------|
| | 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, devido ao limite da técnica.

