



Mycoplasma spp. PCR

Instruções de uso

REF VET087

Revisão: Janeiro/2026

Bioclin · QUIBASA

ÍNDICE

Finalidade	3
Princípio de Ação	3
Apresentação	3
Reagentes	4
Equipamentos e Insumos Operacionais	4
Condições de Armazenamento e Transporte	4
Cuidados Especiais	4
Amostras	5
Procedimento	6
A. Extração do DNA	6
B . Preparo dos Reagentes	6
C . Diluição dos Padrões Quantitativos	6
D. Preparo da PCR	7
E . Definições do termociclador para a PCR em Tempo Real	8
F . Validação do Resultado	9
G . Interpretação do resultado	10
Limitações do Processo	10
Sensibilidade Analítica	11
Significado Clínico	11
Referências Bibliográficas	11
Atendimento ao Consumidor	12
Simbologia Universal	13

FINALIDADE

Teste para detecção quantitativa do DNA de espécies do gênero *Mycoplasma* em amostras biológicas através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Produto desenvolvido para diagnóstico molecular veterinário *in vitro*. O uso deve ser restrito a profissionais qualificados e conforme as legislações e normas técnicas aplicáveis.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

O kit **Bio Gene Vet *Mycoplasma* spp. PCR** é um ensaio *in vitro* baseado na detecção quantitativa do DNA de espécies do gênero *Mycoplasma* através da PCR em tempo real. O método de PCR em tempo real é usado para amplificar o DNA do patógeno. Um termociclador de PCR em tempo real é usado para amplificar e detectar a sonda fluorescente. O software do aparelho calcula a concentração de DNA do patógeno expressa em cópias/ μL , utilizando a curva padrão gerada a partir do padrão quantitativo contido no kit.

APRESENTAÇÃO

Reagente	Apresentação	
	Bio Gene Vet <i>Mycoplasma</i> spp. PCR	
	50 Testes	100 Testes
R1	1 x 55 μL	1 x 110 μL
R2	1 x 500 μL	1 x 1,0 mL
R3	1 x 55 μL	1 x 110 μL
R4	1 x 250 μL	1 x 500 μL
R5	1 x 750 μL	1 x 1,5 mL
R6	1 x 750 μL	1 x 1,5 mL
R7	1 x 250 μL	1 x 500 μL

REAGENTES

- R1. Solução PCR:** Primer, Sonda, TRIS-HCl.
- R2. Mix Taq:** Polimerase, dNTPs, MgCl₂, Estabilizantes.
- R3. Solução PCR Cl:** Primer, Sonda, TRIS-HCl.
- R4. Padrão A (2 x 10⁸ cópias/μL):** Plasmídeo, TRIS-HCl, EDTA.
- R5. Diluente:** TRIS-HCl, EDTA.
- R6. Água:** Água livre de DNase/RNase.
- R7. Controle Interno:** Plasmídeo, TRIS-HCl, EDTA.

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no quadro anterior.
- Instruções de uso (manual).

Materiais necessários, mas não contidos no kit:

- 1- Sistema ótico programável de detecção de fluorescência (Termociclador Real-Time PCR);
- 2- Capela de fluxo laminar;
- 3- Tubos de centrifuga de 1,5 mL;
- 4- Tubos ou placas para PCR;
- 5- Luvas de látex descartáveis livres de pó ou material similar;
- 6- Microcentrifuga;
- 7- Vórtex;
- 8- Micropipetas e ponteiros estéreis com filtro (0,5-10 μL, 10-100 μL, 100-1000 μL);
- 9- Kit para extração de ácidos nucleicos ;

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento e transporte é de -20°C (-10 a -30°C). Evite realizar mais de cinco ciclos de congelamento e descongelamento dos reagentes. Caso seja necessária uma utilização mais frequente, recomenda-se a aliquotagem dos reagentes para preservar sua estabilidade e desempenho. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

CUIDADOS ESPECIAIS

- 1- Produto desenvolvido para diagnóstico molecular veterinário *in vitro*. O uso deve ser restrito a profissionais qualificados e conforme as legislações e normas técnicas aplicáveis.
- 2- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.

3- Manusear e descartar todas as amostras biológicas, reagentes e materiais utilizados para realização do ensaio como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evitar contato direto com as amostras biológicas e os reagentes. Evitar derrames ou aerossol. Os resíduos devem ser manuseados e descartados de acordo com as medidas de segurança adequadas.

4- Procedimentos de biologia molecular, tais como a extração de ácidos nucleicos, transcrição reversa, amplificação e detecção requerem pessoal qualificado para evitar o risco de resultados errados, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos contidos nas amostras ou contaminação da amostra por produtos de amplificação.

5- É necessário dispor de áreas separadas para a extração/preparação de reações e para a amplificação/detecção de produtos. Nunca introduzir um produto de amplificação na área destinada para a extração ou preparação de reações.

6- Todas as amostras e reagentes devem ser manipulados sob uma capela de fluxo laminar. As pipetas devem ser usadas com ponteiros com filtro. As ponteiros empregadas devem ser estéreis, livres de DNases e RNases.

7- Evitar o congelamento e descongelamento repetido dos reagentes.

8- Armazenar as amostras de DNA a -20°C, caso não sejam utilizadas imediatamente.

9- Não usar o kit após a data de validade.

10- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.

11- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FDS (Ficha com Dados de Segurança) disponibilizadas no site www.bioclin.com.br ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.

12- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.

13- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

AMOSTRAS

Este kit pode ser utilizado com amostras de DNA extraídas de swab nasal, swab de orofaringe, swab vaginal, sangue total (EDTA), leite, sêmen ou tecidos (baço, fígado, pulmão, linfonodos). A seleção da amostra para PCR de *Mycoplasma* spp. deve considerar a espécie animal, o local primário de infecção e a fase clínica.

Outros tipos de amostra podem ser utilizados de acordo com recomendações médicas ou do próprio laboratório. As amostras devem ser coletadas de acordo com as recomendações do laboratório para testes moleculares. Devem ser transportadas e armazenadas entre 2 e 8°C por 3 dias¹.

Utilizar amostras de DNA adequadas à amplificação por PCR com pureza e concentração adequadas. Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido.

PROCEDIMENTO

A. Extração do DNA

Os ácidos nucleicos (DNA) das amostras devem ser extraídos seguindo as instruções de uso do kit escolhido. Para o controle do processo de extração, o **Controle Interno (R7)** deve ser preparado (vide item B) e adicionado às amostras durante a extração, conforme descrito abaixo:

1- Adicionar 5 µL do **Controle Interno (R7)** a cada tubo contendo as amostras já ressuspendidas em tampão de extração / lise.

2- Completar o processo de extração de acordo com as instruções de uso do kit de extração.

OBS.: Nunca adicionar o **Controle Interno (R7)** diretamente à amostra biológica pura, pois pode resultar em degradação do mesmo.

B. Preparo dos reagentes

Os reagentes **R4** e **R7** contêm molde de DNA e devem ser manipulados em área apropriada para evitar a contaminação dos demais reagentes.

1- Centrifugar (pulso spin) os reagentes **Solução PCR (R1)**, **Solução PCR CI (R3)**, **Padrão A (R4)** e **Controle Interno (R7)** antes da abertura dos microtubos.

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

C. Diluição dos Padrões Quantitativos

1- Separar 3 microtubos (não fornecidos no kit) adequados para a diluição seriada do **Padrão A (R4)**.

2- Pipetar 90 µL do **Diluyente (R5)** em cada microtubo e nomeá-los como B, C e D respectivamente.

- 3- Em seguida, pipetar 10 µL do **Padrão A (R4)** no microtubo B e homogeneizar.
- 4- Trocar a ponteira e pipetar 10 µL do microtubo B no microtubo C e homogeneizar.
- 5- Trocar a ponteira e pipetar 10 µL do microtubo C no microtubo D e homogeneizar.
- 6- No final da diluição temos padrões A, B, C e D com as seguintes concentrações:

Padrão A – 2×10^5 cópias/µL

Padrão B – 2×10^4 cópias/µL

Padrão C – 2×10^3 cópias/µL

Padrão D – 2×10^2 cópias/µL

**A diluição da curva padrão deve ser realizada para o teste quantitativo.*

D. Preparo da PCR

- 1- Separar previamente os microtubos/poços a serem utilizados, de acordo com o número de amostras, Controles e Padrões Quantitativos a serem analisados.
- 2- Preparar o volume da solução de PCR final de acordo com o número de reações a ser realizadas.

Reagentes	1 Reação/ Teste	25 Reações/ Testes	50 Reações/ Testes	100 Reações/ Testes
Mix Taq (R2)	10 µL	250 µL	500 µL	1 mL
Solução PCR (R1)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Solução PCR CI (R3)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Água (R6)	3 µL	75 µL	150 µL	300 µL

Para o preparo de número de reação diferente deve-se multiplicar o volume dos reagentes para 1 reação pelo número de reações necessárias.

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

4- Adicionar 5 µL do DNA extraído da amostra ou 5 µL do Padrão Quantitativo ou 5 µL de **Água (R6)**, usada como controle negativo.

5- Homogeneizar bem.

6- Observe que o volume total da reação é de 20 µL, e cada corrida de PCR deve incluir os controles relevantes (Controle Negativo e Padrões Quantitativos).

7- Homogeneizar bem.

8- Transporte os tubos/placa para o termociclador.

E. Definições do termociclador para a PCR em Tempo Real

Verificar o manual de operação do equipamento de PCR em tempo real para a programação do experimento.

1- Defina o tipo de experimento:

Teste Quantitativo com Curva Padrão ou Teste Qualitativo.

OBS.: No caso do teste qualitativo, o **Padrão A (R4)** pode ser utilizado como Controle Positivo de amplificação.

2- Defina os detectores (sondas) fluorescentes como:

Alvo	Detector	Quencher
<i>Mycoplasma</i> spp.	FAM	NFQ-MGB
Controle Interno	VIC	

OBS.:

- Os Padrões Quantitativos não apresentam o Controle Interno (VIC), pois o mesmo é utilizado para o controle da extração e da amplificação das amostras.
- As amostras extraídas devem ser marcadas com os detectores FAM e VIC.

3- Defina os Padrões Quantitativos (Standards) como*:

Padrão A – 2×10^5 cópias/µL

Padrão B – 2×10^4 cópias/µL

Padrão C – 2×10^3 cópias/µL

Padrão D – 2×10^2 cópias/µL

**Programação utilizada no teste quantitativo.*

4- Defina as condições dos ciclos:

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	95°C	3 minutos	1
2	95°C	15 segundos	45
	60°C	60 segundos	

Defina "Data Collection" como "stage 2, step 2 (60 - 0:60)".

F. Validação do Resultado

1- Curva padrão

Curva padrão	Faixa permitida	Amplificação/Deteção
Coefficiente de correlação (R^2)	$0,99 \leq R^2 \leq 1,00$	Válida

Se o valor de R^2 não ficar entre os limites da faixa permitida, o resultado é considerado inválido e o teste deve ser repetido.

2- Amostras

<i>Mycoplasma</i> spp.		Resultado	Deteção
FAM	VIC		
Presença de amplificação ou Concentração determinada	CT \leq 35	Positivo	Válida
	CT $>$ 35	Positivo	Inválida*
Ausência de amplificação ou Concentração indeterminada	CT \leq 35	Negativo	Válida
	CT $>$ 35	Negativo	Inválida*

***OBS.:** Os valores de CT do Controle Interno variam de acordo com as condições do processo, como a eficiência da extração do DNA, a concentração das amostras e as configurações do termociclador. Logo, estas condições

devem ser avaliadas quando os valores de CT não forem adequados e, se pertinente, os resultados podem ser validados.

Exemplo: Amostras com alto número de cópias de DNA podem, em alguns casos, inibir a amplificação do Controle Interno resultando em valor de CT fora da faixa ideal, este resultado não invalida o teste.

Se os requisitos acima não forem cumpridos, o ensaio é considerado inválido e o teste deve ser repetido.

G. Interpretação do resultado

O kit é capaz de detectar de 10 a 1.000.000 de cópias por reação.

O software do termociclador calcula automaticamente a concentração das amostras.

Exemplo: Se o programa mostrar uma concentração como 2.00E+005, então a concentração da amostra será 2.0×10^5 cópias/ μ L.

Resultado da Amostra em cópias/ μ L (FAM)	Cópias por reação
$\geq 1 \times 10^6$	> 1.000.000
$2 \leq \text{Quantidade} \leq 9 \times 10^5$	Quantidade obtida
< 2	< 10

A não detecção do DNA do patógeno não exclui a presença de infecção quando o título do patógeno estiver abaixo do limite de detecção deste kit.

Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

Os resultados obtidos devem ser avaliados considerando os dados clínicos e os exames laboratoriais do paciente.

Limitações do Processo

Contaminações cruzadas que ocorrem durante a coleta da amostra, processamento, transporte e armazenamento poderão ocasionar resultados falsos.

Sensibilidade Analítica

A técnica foi capaz de detectar aproximadamente 2 moléculas alvo em 1 µL do produto de extração de DNA adicionado a reação de amplificação.

OBS.: A sensibilidade analítica do produto pode sofrer interferência de fatores como a eficiência do kit/método utilizado para a extração dos ácidos nucleicos, e a sensibilidade do equipamento termociclador em tempo real usado.

Significado Clínico

O gênero *Mycoplasma* é composto por mais de 190 espécies, algumas de vida livre e outras parasitas, com amplo espectro de hospedeiros (mamíferos, aves, peixes, répteis, artrópodes e plantas). Os micoplasmas distinguem-se de outras bactérias pelo reduzido tamanho (0,3–0,8 µm) e pela ausência de parede celular, característica que os torna intrinsecamente resistentes a antibióticos que atuam sobre a síntese de peptidoglicano, como as penicilinas e cefalosporinas. Diversas espécies possuem relevância veterinária, acometendo principalmente o trato respiratório, urogenital e o sangue de animais domésticos, como *Mycoplasma bovis* em bovinos, *Mycoplasma gallisepticum* em aves e os hemoplasmas (*M. haemofelis*, *M. haemocanis*) em cães e gatos. A detecção por PCR em tempo real é considerada o método de escolha na rotina diagnóstica por apresentar alta sensibilidade, especificidade e rapidez, superando as limitações dos métodos tradicionais de cultivo e sorologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
2. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1998;62(4):1094–1156.
3. Washburn, L.R. Experimental models of arthritis. In: Tully, J.G. & Razin, S. (Editors) Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology. Vol.2, Academic Press, Inc. San Diego, CA.USA, 1996, p.349-359.



QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 – Santa Branca
CEP 31565-130 – Belo Horizonte – MG – Brasil
Tel.: (31) 3439.5454
E-mail: sac@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 – Indústria Brasileira

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente
Tel.: 0800 0315454
E-mail: sac@bioclin.com.br

SIMBOLOGIA UNIVERSAL

	NÚMERO DE CATÁLOGO		FABRICADO POR
	NÚMERO DO LOTE		CONTROLE
	DATA DE FABRICAÇÃO		CONTROLE POSITIVO
	DATA DE VALIDADE (último dia do mês)		CONTROLE NEGATIVO
	LIMITE DE TEMPERATURA (conservar a)		RISCO BIOLÓGICO
	O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTE		INFLÂMÁVEL
	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CORROSIVO
	PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PROTEGER DA LUZ E CALOR		NÃO UTILIZAR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA
	NÃO REUTILIZE		PRODUTO ESTERELIZADO
	CUIDADO		PERIGO

BIO GENE VET

Bioclin · QUIBASA

Bioclin · QUIBASA

 Rua Teles de Menezes, 92 . Belo Horizonte . MG . Brasil . CEP: 31565-130
Tel +55 31 3439 5454 . www.bioclin.com.br
FARM. RESP. Sílvia Wandalsen Arndt - CRF MG 7422
C.N.P.J.: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira