

6. PRODUTO TÉCNICO-TECNOLÓGICO

	Procedimento Operacional Padrão	Data de Emissão: __/__/__
		Data de Revisão: __/__/__
	Protocolo para Detecção de <i>Mycoplasma</i> spp.	Nº da Revisão:
		Página: 1 de 5

SUMÁRIO

1. OBJETIVO.....
2. CAMPO DE APLICAÇÃO.....
3. EQUIPAMENTOS E INSUMOS.....
4. SIGLAS.....
5. DEFINIÇÕES.....
6. PROCEDIMENTO.....
7. REFERÊNCIAS.....

	Nome:	Cargo:	Data:	Assinatura:
Elaboração:				
Liberação:				

Aprovação:				
------------	--	--	--	--

	Procedimento Operacional Padrão	Data de Emissão: __/__/__
	Protocolo para Detecção de <i>Mycoplasma</i> spp.	Data de Revisão: __/__/__
		Nº da Revisão:
		Página: 2 de 5

1. OBJETIVO

Padronizar a técnica da PCR em Tempo Real baseada na metodologia SYBR Green, para diagnóstico e detecção de *Mycoplasma* spp.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Esse procedimento aplica-se a detecção de *Mycoplasma* spp. através da técnica de qPCR no laboratório Pargen.

3. EQUIPAMENTOS E INSUMOS

- ✓ Amostra de DNA extraído
- ✓ Vortex
- ✓ Micropipetas
- ✓ Luvas sem pó
- ✓ Ponteiras
- ✓ Águas livre de nucleases
- ✓ Primers
- ✓ Brilliant III SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent)
- ✓ Centrífuga
- ✓ Álcool 70%
- ✓ Microtubo de 2 mL

4. SIGLAS

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR: PCR em Tempo Real

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

	Procedimento Operacional Padrão	Data de Emissão: __/__/__
	Protocolo para Detecção de <i>Mycoplasma</i> spp.	Data de Revisão: __/__/__
		Nº da Revisão:
		Página: 3 de 5

5. DEFINIÇÕES

Para os efeitos deste Procedimento Operacional Padrão, aplicam-se as seguintes definições:

Amostra de DNA: amostra previamente extraída de bactérias do gênero *Mycoplasma* spp. provenientes de cães e gatos.

Primers: são pequenos fragmentos de DNA, complementares e específicas as extremidades do fragmento alvo de DNA.

No Template Control: ele é configurado da mesma forma que os outros poços com DNA, porém sem amostra de DNA molde.

Água livre de nucleases: água ultrapura livre de contaminantes, pois as nucleases podem degradar os ácidos nucleicos e ocorrer uma falha no processo de PCR.

Master Mix: solução que contém todos os reagentes necessários para a reação qPCR com exceção do DNA alvo e primers.

6. PROCEDIMENTO

- A. Utilizar todos os EPIs (Equipamento de proteção individual).
- B. Retirar do freezer os reagentes e as amostras de DNA, aguardar um tempo para descongelar a temperatura ambiente.
- C. Utilizar o agitador vortex para homogenizar os reagentes e centrifugar
- D. Preparar a solução mix em um microtubo de 2,0 ml. A reação qPCR foi padronizada em um volume final de 20 μ L, contendo 10 μ L do master mix, 7,0 de

	Procedimento Operacional Padrão	Data de Emissão: __/__/__
	Protocolo para Detecção de <i>Mycoplasma</i> spp.	Data de Revisão: __/__/__
		Nº da Revisão:
		Página: 4 de 5

água livre de nucleases, 0,5 de primer reverse, 0,5 de primer forward e 2 μL de DNA para cada amostra conforme apresentado na tabela 1.

E. Identificar os tubos.

F. Logo em seguida, homogenizar a solução de 10 μL e transferir para cada microtubo de 0,2 μL .

G. Ligar o equipamento de qPCR e configurar o software nas condições de ciclagem de acordo com a tabela 2.

Tabela 1. Volume dos reagentes

Reagentes	Volume
Master Mix	10 μL
Água livre de nucleases	7 μL
Primer forward	0,5 μL
Primer reverse	0,5 μL
DNA	2 μL

Tabela 2: Condições de ciclagem.

Temperatura	Duração	Nº de ciclos	Estágio
95°C	3 minutos	1	Desnaturação
95°C	10 segundos	40	Desnaturação
60°C	20 segundos		Anelamento/extensão
45°C-95°C	5 min	1	Curva de melting

	Procedimento Operacional Padrão	Data de Emissão: __/__/__
	Protocolo para Detecção de <i>Mycoplasma</i> spp.	Data de Revisão: __/__/__
		Nº da Revisão:
		Página: 5 de 5

6.1 Interpretação dos resultados:

- A. Amostras positivas devem mostrar curva de amplificação do gráfico superior e um pico de melting entre 80°C e 81°C do gráfico inferior.
- B. A ausência do pico de melting caracteriza amostras negativas. Em caso de amplificação no controle negativo os resultados das amostras devem ser descartados e o ensaio deve ser repetido.

7. REFERÊNCIAS:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14500: **Gestão da qualidade no laboratório clínico**. Rio de Janeiro, p. 12, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR ISO 9001:2015, **Sistemas de Gestão da Qualidade – Requisitos**. Rio de Janeiro, 2015.

BUSTIN, S. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, vol. 55, n. 4, p 611–622, abril. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>> Acesso em: 27 jul. 2022.

DUARTE, Renato. **“Procedimento Operacional Padrão” - A Importância de se padronizar tarefas nas BPLC** –. Belém, 2005.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi desenvolvido um POP, para a detecção de espécies de *Mycoplasma* spp. através de um par de oligonucleotídeos iniciadores que amplificam a região 16S rRNA desses microrganismos. Através da otimização, os primers demonstraram ser específicos para a detecção de *Mycoplasma* spp., não amplificando os outros hemoparasitas.

Os testes de validação comprovaram sua eficiência de amplificação em diferentes temperaturas e concentrações realizados em triplicata. O limite inferior de detecção foi de 4 cópias de DNA e as 20 amostras investigadas, 11 amplificaram para *Mycoplasma* spp. Dessa forma, a produção do POP garante a padronização de serviços e produtos e oferece um ensaio clínico seguro e de qualidade que pode ser usado em laboratório de análises clínicas.