

**Kit para detecção de *Mycoplasma* spp por qPCR**

**Código: 13-200RTMYC**

**Apresentação: 100 testes**

**Armazenamento: -20°C**

**Introdução:**

Desde o início da utilização dos antibióticos, o problema das contaminações bacterianas e fúngicas nos meios de cultivo celular foram minimizadas, porém os Micoplasmas passaram a ser os contaminantes detectados com maior frequência em células animais cultivadas *in vitro* (1).

As contaminações por *Mycoplasma* spp podem provocar alterações nas células infectadas, tais como mudanças nas características da replicação e crescimento celular, na composição e estrutura da membrana plasmática, nos processos de proliferação e a suscetibilidade às infecções virais, resultando em experimentos falhos e até mesmo produtos biológicos com potencial de risco.

Os Micoplasmas são os menores e mais simples organismos autoreplicativos. Não possuem parede celular e o seu crescimento está fortemente associado às membranas celulares de células de mamíferos.

Na maioria dos casos não existem sinais visíveis de contaminação por *Mycoplasma*. Os Micoplasmas não podem ser detectados através de inspeção visual e não causam mudanças perceptíveis, visíveis na cultura celular, tais como rápida mudança do pH e presença de turbidez. Os Micoplasmas podem permanecer indetectáveis nos cultivos celulares, por longos períodos.

A detecção de espécies de *Mycoplasma*, contaminantes de cultivos celulares, pode ser

realizada por métodos como, o isolamento em meio de cultura em anaerobiose e sua classificação por testes bioquímicos e por técnicas imunológicas, no entanto, estas metodologias podem demorar entre 2 a 4 semanas para fornecer um resultado conclusivo. Essas rotinas são também, restritas a laboratórios especializados, deste modo as metodologias baseadas em análises moleculares são mais rápidas, diretas e específicas, ao mesmo tempo, os resultados podem ser obtidos em questão de horas (2).

**Descrição:**

O principal propósito deste kit é a detecção da contaminação dos cultivos celulares por *Mycoplasma* spp, através da técnica de PCR quantitativo com a utilização de uma master-mix otimizada com *SybrGreen*, a qual inclui o fluoróforo Rox como controle interno de reação. Seu uso na rotina se faz de maneira rápida e eficaz. A mix otimizada vem acompanhada de *primers* genéricos para classe Mollicutes que possibilita a amplificação de fragmentos de diversas espécies de *Mycoplasma*. (3)

A finalidade deste kit é monitorar a presença de *Mycoplasma* spp em cultivos celulares.

As amostras de DNA poderão ser obtidas através de diversas metodologias (boiling, extração de DNA por metodologias baseadas na utilização de fenol, isocianato, etc.) entre outros.

**Conteúdo do kit:**

Tubos	Apresentação
qPCR-LGC SybrGreen Rox Plus – Mix para <i>Mycoplasma</i>	1 x 1,25 mL (tubo de tampa verde)
Água ultra-pura DEPC tratada	2 x 1,25 mL (tubo de tampa transparente)
<i>Primers mix</i>	200 µL
DNA controle	100 µL (tubo de tampa transparente)

**Exemplo de reação:**

Reagentes	Volume
Sybr Green Rox Plus Mix	12,5 µL
DNA	1 µL
<i>Primers mix</i>	2 µL
Água DEPC tratada	9,5 µL

**Exemplo de programa para amplificação:**

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Ativação da enzima	95°C	15 min	1 ciclo
Desnaturação	95°C	15 s	40 ciclos
Anelamento	50-60°C	30 s	
Extensão	72°C	30 s	
Melting curve	65-95°C	20 Seg	1 ciclo

**Referências bibliográficas:**

- 1) Camargos, M. F. et al., *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n3, p. 786-790, 2008.
- 2) Van Kuppeveld, F. J. M., et al., *Applied and environmental microbiologia*, v. 60, n1, p. 149-152, 1994.
- 3) Mendes de Córdova, C. M. and Flório da Cunha, R. A., *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 38, n2, p.11-18, 2002.