

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:

- Camargos, M. F. et al., *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n3, p. 786-790, 2008.
- Van Kuppeveld, F. J. M., et al., *Applied and environmental microbiologia*, v. 60, n1, p. 149-152, 1994.
- 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.