

Protocolo de uso do conjunto de primers e sondas para detecção de *Anaplasma platys* (ROX) por PCR em Tempo Real (qPCR)

APLAT-50
50 reações
Transporte: -20°C

1. USO PRETENDIDO

O conjunto de reagentes é utilizado para a detecção de sequências do DNA de *Anaplasma platys* a partir de amostras biológicas submetidas a métodos de extração e purificação de DNA.

2. PRINCÍPIO DO TESTE

A técnica de PCR em Tempo Real (qPCR) permite determinar a presença da sequência alvo de DNA, através da amplificação de parte de regiões específicas de material genético e multiplicar em milhões de cópias. Para que seja possível amplificar determinado fragmento, é necessário conhecer a sequência a ser amplificada e utilizar alguns reagentes e componentes específicos. Não é recomendado o uso de "Referência Passiva" durante a reação de qPCR. Desabilite esta opção na programação do equipamento a ser utilizado

3. EQUIPAMENTOS E INSUMOS NÃO FORNECIDOS

Equipamentos: *Workstation* para PCR, micropipetas calibradas de volume variável (0,5 a 1000µL), agitador tipo Vórtex, banho maria ou estufa e termociclador de PCR em Tempo Real com filtros para leitura dos fluoróforos **ROX**.

Insumos: Microtubos de 1,0 a 2 mL, ponteiras com filtro de 0,5 a 1000µL, placas de PCR específicas de acordo com o modelo/ fabricante do termociclador e selantes óticos para as placas de PCR de acordo com o modelo/fabricante do termociclador qPCR.

Reagentes disponibilizados:

Componentes	Descrição	Quantidade	Volume
2X Tampão de reação RT-qPCR	Mistura de qPCR	1 frasco	1,0 mL
Primers e Probes <i>Anaplasma platys</i> / ROX	Oligonucleotídeos e Sondas Fluorescentes	1 frasco	100 µL
Enzima qPCR	Tampão da Enzima	1 frasco	50 µL
Água	Água ultrapura <i>DNase</i> e <i>RNase</i> Free	1 frasco	1,0 mL
Controle Positivo (5µL = 2.500.000 Cópias/mL)	DNA Sintético para <i>Anaplasma platys</i>	1 frasco	100 µL

Tabela 1 – Reagentes utilizados na reação



4. PREPARO DA AMOSTRA

O DNA deve ser extraído usando kit de extração de ácido nucléico, de acordo com as instruções do fabricante.

O DNA extraído deve ser armazenado em gelo ou à 4 °C, até momento do uso, ou a -20°C para armazenamento em longos períodos.

5. REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

- Preparar Mix da reação, conforme a Tabela 2, em tubo de 1,5 mL.
- Adicione 15µL do Mix da reação em tubos de 0,2mL ou placas, de acordo com o equipamento.
- Adicione 5µL da amostra ao poço contendo o mix da reação.
- Adicione 5µL do Controle Positivo em um diferente poço contendo o mix da reação.
- Homogeneíze com auxílio de uma pipeta.
- Levar ao equipamento para a leitura.

Observação¹ - Todo o procedimento deve ser feito com os tubos em gelo.

Observação² - Não deve ser ultrapassado 30 minutos entre o preparo do Mix e o início da leitura da reação no equipamento.

Reação 1	
2X Tampão de reação RT-qPCR	10,0 µL
Primers e Probes <i>Anaplasma platys</i> / ROX	2,0 µL
Enzima qPCR	1,0 µL
Água	2,0 µL
Controle Positivo ou Amostra	5,0 uL
Volume final de reação	20,0 µL

Tabela 2– Preparo do Mix de reação

6. CONFIGURAÇÃO DO EQUIPAMENTO DE PCR EM TEMPO REAL

Defina os canais de fluorescência e programe o *termociclador*, de acordo com as instruções do fabricante. O volume total da reação é de 20uL, um controle positivo e um negativo são necessários para cada ensaio, independentemente da quantidade de amostras processadas.

O equipamento deve ser configurado em 2 etapas, conforme descrito na Tabela 3:

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	95 °C	2 minutos	1
2	95 °C	15 segundos	40
	60 °C*	45 segundos	

* selecionar a leitura da fluorescência na etapa 2 - 60 °C.

**desativar a opção "Referência Passiva" no equipamento.

Tabela 3 – Programa de ciclagem

Canais de detecção do setup de Programas de fluorescências:

Alvo	Fluoróforo
<i>Anaplasma platys</i>	ROX

Tabela 4 – Canais de detecção

7. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

As amostras que apresentarem sinal de fluorescência, isto é, amplificação para o alvo no canal de fluorescência **ROX** com Ct abaixo de 40 serão consideradas positivas para a detecção do respectivo alvo.

O resultado do teste será considerado **DETECTADO OU POSITIVO**.

As amostras que **NÃO** apresentarem sinal de fluorescência, isto é, não amplificarem para o alvo no canal de fluorescência **ROX**, serão consideradas negativas para a detecção do respectivo alvo.

O resultado do teste será considerado **NÃO DETECTADO OU NEGATIVO**

Alvo	Resultado Ct (fluoróforo)	Interpretação
<i>Anaplasma platys</i> (ROX)	<40 (ROX)	Positivo para <i>Anaplasma platys</i>
<i>Anaplasma platys</i> (ROX)	ND (ROX)	Negativo para <i>Anaplasma platys</i>

Tabela 5 – Interpretação dos resultados

8. POSSÍVEIS PROBLEMAS ENCONTRADOS

Problema	Provável Causa	Recomendação
Sem detecção de sinal em nenhum dos canais, incluindo o controle positivo	Operação inadequada do equipamento	Verificar a calibração do equipamento e repetir a reação sob condições corretas.
	Preparo incorreto da reação	Checar todos os reagentes e repetir reação
	Reagentes armazenados de forma inadequada	Repetir a reação com novos reagentes
Sem detecção de sinal do Controle Positivo.	Preparação incorreta da reação.	Verificar o protocolo e repetir a reação.
	Armazenamento inadequado da reação e/ou possível contaminação da amostra.	Evitar congelar e descongelar o várias vezes. Quando descongelado, manter o controle positivo em gelo, isso irá impedir a degradação. Se possível aliquotar o controle e utilize apenas no uso.

9. FONTES POTENCIAIS DE VARIABILIDADE

Pipetagem, calibração de pipetas e qualidade do DNA extraído.

10. INTERFERÊNCIAS

Resíduos de fenol, clorofórmio, sais e etanol provenientes da purificação do DNA. Para tanto, recomenda-se uma padronização da eficiência de extração com elevado rendimento para evitar estes interferentes.

