

Protocolo de uso do conjunto de primers e sondas para detecção de *Ehrlichia spp* (FAM) por PCR em Tempo Real (qPCR)

Código: ESPP-50
50 reações
Transporte: -20°C

1. USO PRETENDIDO

O conjunto de reagentes é utilizado para a detecção de sequências do DNA de *Ehrlichia spp* 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 e termociclador de PCR em Tempo Real com filtros para leitura dos fluoróforos FAM.

Insumos: Microtubos de 0,2, 1,0 a 2 mL, ponteiras com filtro de 0,5 a 1000µL, placas ou tubos 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>Ehrlichia spp</i> / FAM	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>Ehrlichia spp</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>Ehrlichia spp/ FAM</i>	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
	55 °C*	45 segundos	

* selecionar a leitura da fluorescência na etapa 2 - 55 °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>Ehrlichia spp</i>	FAM

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 **FAM** 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 **FAM**, 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>Ehrlichia spp</i> (FAM)	<40 (FAM)	Positivo para <i>Ehrlichia spp</i>
<i>Ehrlichia spp</i> (FAM)	ND (FAM)	Negativo para <i>Ehrlichia spp</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.

