



FIV/FeLV Multiplex PCR

Instrução de uso

REF G132-4

Revisão: Julho/2025

Bioclin · QUIBASA

ÍNDICE

Finalidade	3
Princípio de Ação	3
Apresentação	3
Reagentes	4
Equipamentos e Insumos Operacionais	4
Condições de Armazenamento e Transporte	4
Cuidados Especiais	4
Amostras	6
Procedimento	6
A. Extração do RNA	6
B . Preparo dos Reagentes	6
C . Preparo da PCR	7
D . Definições do termociclador para a PCR em Tempo Real	8
E . Validação do Resultado	9
F . Interpretação do resultado	9
Limitações do Processo	10
Sensibilidade Analítica	10
Significado Clínico	11
Referências Bibliográficas	12
Atendimento ao Consumidor	12
Simbologia Universal	13

FINALIDADE

Teste para detecção qualitativa dos RNAs dos vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e da Leucemia Felina (FeLV) em amostras biológicas através da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real. Produto de uso exclusivo em Pesquisa (**RUO – Research Use Only**). Para outras finalidades, seguir as orientações preconizadas nas legislações aplicáveis.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

O kit **Bio Gene Vet FIV/FeLV Multiplex PCR** é um ensaio *in vitro* baseado na detecção qualitativa dos RNAs de FIV e FeLV através da RT-PCR em tempo real. O método de RT-PCR em Tempo Real é usado para amplificar o RNA dos patógenos. Um termociclador de PCR em Tempo Real é usado para amplificar e detectar a sonda fluorescente.

APRESENTAÇÃO

Reagente	Apresentação
	Bio Gene Vet FIV/FeLV Multiplex PCR
	100 Testes
R1	1 x 110 µL*
R2	1 x 1,1 mL*
R3	1 x 1,5 mL
R4	1 x 500 µL*
R5	1 x 1,5 mL
R6	1 x 1,5 mL
R7	1 x 500 µL*

*Reagentes liofilizados. Os volumes descritos acima correspondem ao volume final após a ressuspensão dos reagentes, conforme descrito no item PROCEDIMENTO, subitem B. (Preparo dos Reagentes).

REAGENTES

- R1. Solução PCR:** Primer, Sonda, TRIS-HCl.
- R2. Mix Taq:** Polimerase, dNTPs, MgCl₂, Estabilizantes.
- R3. Tampão Mix:** TRIS-HCl.
- R4. Controle Positivo:** Plasmídeo, TRIS-HCl, EDTA.
- R5. Diluente:** TRIS-HCl, EDTA.
- R6. Água:** Água livre de DNase/RNase.
- R7. Controle Interno:** Plasmídeo, TRIS-HCl.

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no quadro anterior.
- Instrução de uso (manual).

Materiais necessários, mas não contidos no kit:

- 1- Sistema ótico programável de detecção de fluorescência (Termociclador Real-time PCR);
- 2- Capela de fluxo laminar;
- 3- Tubos de centrifuga de 1,5 mL;
- 4- Tubos ou placas para PCR;
- 5- Luvas de látex descartáveis livres de pó ou material similar;
- 6- Microcentrifuga;
- 7- Vórtex;
- 8- Micropipetas e ponteiras estéreis com filtro (0,5-10µL, 10-100µL, 100-1000µL);
- 9- Kit para extração de ácidos nucleicos;

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento é de -20°C (-10 a -30°C).

Após a ressuspensão dos reagentes liofilizados, o produto é estável por 6 meses a partir da data de ressuspensão.

Deve-se evitar o congelamento e descongelamento. O transporte pode ser feito em temperaturas entre 2 e 30°C por 7 dias. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

CUIDADOS ESPECIAIS

- 1- Produto de uso exclusivo em Pesquisa (**RUO – Research Use Only**). Para outras finalidades, seguir as orientações preconizadas nas legislações aplicáveis.
- 2- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos;

- 3- Manusear e descartar todas as amostras biológicas, reagentes e materiais utilizados para realização do ensaio como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evite contato direto com as amostras biológicas e os reagentes. Evitar derrames ou aerossol. Os resíduos devem ser manuseados e descartados de acordo com as medidas de segurança adequadas.
- 4- Procedimentos de biologia molecular, tais como a extração de ácidos nucléicos, transcrição reversa, amplificação e detecção requerem pessoal qualificado para evitar o risco de resultados errados, especialmente devido à degradação de ácidos nucléicos contidos nas amostras ou contaminação da amostra por produtos de amplificação.
- 5- É necessário dispor de áreas separadas para a extração/preparação de reações e para a amplificação/detecção de produtos. Nunca introduzir um produto de amplificação na área destinada para a extração ou preparação de produtos de amplificação.
- 6- Todas as amostras e reagentes devem ser manipulados sob uma capela de fluxo laminar. As pipetas devem ser usadas com ponteiras com filtro. As ponteiras empregadas devem ser estéreis, livres de DNases e RNases.
- 7- Evitar o congelamento e descongelamento repetido dos reagentes.
- 8- Armazenar as amostras de RNA a -20°C, caso não forem utilizadas imediatamente.
- 9- Não usar o kit após a data de validade.
- 10- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.
- 11- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FDS (Ficha com Dados de Segurança) disponibilizadas no site www.bioclin.com.br ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.
- 12- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.
- 13- **É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.**

AMOSTRAS

Este kit deve ser utilizado com amostras de RNA extraídas de sangue total (EDTA). Outros tipos de amostra podem ser utilizados de acordo com recomendações médicas ou do próprio laboratório. As amostras devem ser coletadas de acordo com as recomendações do laboratório para testes moleculares. Devem ser transportadas e armazenadas entre 2 e 8°C por até 3 dias¹.

Utilizar amostras de RNA adequadas à amplificação por PCR com pureza e concentração adequadas. Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido.

PROCEDIMENTO

A. Extração do RNA

Os ácidos nucléicos (RNA) das amostras devem ser extraídos seguindo as instruções de uso do kit escolhido. Para o controle do processo de extração, o **Controle Interno (R7)** deve ser preparado (vide item B.4) e adicionado às amostras durante a extração, conforme descrito abaixo:

- 1- Adicionar 4µL do **Controle Interno (R7)** a cada tubo contendo as amostras já ressuspendidas em tampão de extração / lise.
- 2- Completar o processo de extração de acordo com as instruções de uso do kit de extração.

OBS.: Nunca adicionar o **Controle Interno (R7)** diretamente à amostra biológica pura, pois pode resultar em degradação do mesmo.

B. Preparo dos reagentes

Os reagentes **R4** e **R7** contém molde de RNA, e eles devem ser manipulados (ressuspendido) em área apropriada para evitar a contaminação dos demais reagentes.

- 1- Centrifugar (pulso spin) os reagentes **Solução PCR (R1)**, **Controle Positivo (R4)** e **Controle Interno (R7)** antes da abertura dos microtubos.
- 2- Ressuspende o reagente **Mix Taq (R2)*** com 1,1 mL do reagente **Tampão Mix (R3)**.

*O **Mix Taq (R2)** não contém fluoróforo de referência passiva (ROX).

3- Ressuspender o reagente **Solução PCR (R1)** com 110 µL do reagente **Água (R6)**.

4- Ressuspender os reagentes, **Controle Positivo (R4)** e **Controle Interno (R7)** com o reagente **Diluyente (R5)** de acordo com a tabela abaixo:

Reagente	Apresentação
	100 testes
Controle Positivo (R4)	500 µL
Controle Interno (R7)	500 µL

C. Preparo da PCR

1- Separar previamente os microtubos/poços a serem utilizados, de acordo com o número de amostras, Controles e Padrões Quantitativos a serem analisados.

2- Preparar o volume da solução de PCR final de acordo com o número de reações a ser realizadas.

Reagentes	1 Reação	25 Reações	50 Reações	100 Reações
Mix Taq (R2)	10µL	250µL	500µL	1mL
Solução PCR (R1)	1µL	25µL	50µL	100µL

Para o preparo de número de reação diferente deve-se multiplicar o volume dos reagentes para 1 reação pelo número de reações necessárias.

3- Pipetar 11µL da solução de PCR final nos tubos ou poços determinados para as reações.

4- Adicionar 9µL do RNA extraído da amostra ou 9µL do **Controle Positivo (R4)** ou 9µL de **Água (R6)**, usada como controle negativo.

5- Homogeneizar bem.

6- Observe que o volume total da reação é de 20µL, e cada corrida de PCR deve incluir os controles relevantes (Controle Negativo e Controle Positivo).

7- Homogeneizar bem.

8- Transporte os tubos/placa para o termociclador.

D. Definições do termociclador para a PCR em Tempo Real

Verificar o manual de operação do equipamento de PCR em tempo real para a programação do experimento.

1- Defina o tipo de experimento:

Teste Qualitativo.

2- Defina os detectores (sondas) fluorescentes como:

Alvo	Detector	Quencher
FeLV	FAM	NFQ-MGB
FIV	Texas Red	
Controle Interno	VIC	

OBS:

- O Controle Positivo não apresenta o Controle Interno (VIC), pois o mesmo é utilizado para o controle da extração e da amplificação das amostras.

3- Defina as condições dos ciclos:

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	55°C	10 minutos	1
2	95°C	3 minutos	1
3	95°C	15 segundos	45
	60°C	60 segundos	

Defina "Data Collection" como "stage 3, step 2 (60°Ce:60)".

E. Validação do Resultado

1- Controles

Controles	Faixa permitida CT	Amplificação/Detecção
Positivos (FAM e Texas Red)	$16 \leq CT \leq 21$	Válida
Negativo	Indeterminado	Válida
Controle Interno (VIC)	$25 \leq CT \leq 31$	Válida*

***OBS:** Os valores de CT do Controle Interno variam de acordo com as condições do processo, como a eficiência da extração do DNA/RNA, a concentração das amostras e as configurações do termociclador. Logo, estas condições devem ser avaliadas quando os valores de CT não forem adequados e, se pertinente, os resultados podem ser validados.

Exemplo: Amostras com alto número de cópias de DNA/RNA podem, em alguns casos, inibir a amplificação do Controle Interno resultando em valor de CT fora da faixa ideal, este resultado não invalida o teste.

Se os requisitos acima não forem cumpridos, o ensaio é considerado inválido e o teste deve ser repetido.

F. Interpretação do resultado

FeLV (FAM)	FIV (Texas Red)	Controle Interno (VIC)	Resultado
Presença de amplificação	Ausência de Amplificação	$25 \leq CT \leq 31$	Positivo FeLV
Ausência de Amplificação	Presença de amplificação		Positivo FIV
Presença de amplificação	Presença de amplificação		Positivo para FeLV e FIV
Ausência de Amplificação	Ausência de Amplificação		Negativo para FeLV e FIV

Obs: O resultado é válido desde que todos os controles apresentem valores entre os limites de faixa permitida e que o aspecto da curva da amostra testada seja semelhante as curvas obtidas no Controle Positivo (R4), com forma sigmóide.

O kit é capaz de detectar de 10 a 1.000.000 de cópias por reação.

A não detecção do RNA do patógeno não exclui a presença de infecção quando o título do patógeno estiver abaixo do limite de detecção deste kit. Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

Os resultados obtidos devem ser avaliados considerando os dados clínicos e os exames laboratoriais do paciente.

Limitações do Processo

Contaminações cruzadas que ocorrem durante a coleta da amostra, processamento, transporte e armazenamento poderão ocasionar resultados falsos.

Sensibilidade Analítica

A técnica foi capaz de detectar aproximadamente 2 moléculas alvo em 9µL do produto de extração de RNA adicionado a reação de amplificação.

OBS: A sensibilidade analítica do produto pode sofrer interferência de fatores como a eficiência do kit/método utilizado para a extração dos ácidos nucleicos, e a sensibilidade do equipamento termociclador em tempo real usado.

Significado Clínico

Os vírus da Leucemia Felina (FeLV) e da Imunodeficiência Felina (FIV) são retrovírus que comumente acometem felinos domésticos e selvagens em todo o mundo. A transmissão ocorre principalmente pelo contato direto e indireto com a saliva contaminada, o compartilhamento de alimentos, bem como através do sangue, fezes e leite materno. O FeLV já foi considerado o maior responsável pela mortalidade de felinos domésticos causando tumores (linfomas), anemia, infecções secundárias por supressão da medula óssea e sistema imunológico. Uma proporção de felinos desenvolve uma infecção progressiva com viremia persistente e sem imunidade específica contra o patógeno.

Já os animais infectados pelo FIV passam por uma fase assintomática prolongada podendo evoluir para um quadro de imunossupressão que pode levar a infecções oportunistas e a quadros neoplásicos. Dentre os sintomas mais comuns, estão: febre, anemia, perda de peso, úlceras na gengiva, doenças de pele. Devido a gravidade dos sintomas causados por FIV e FeLV, torna-se importante o diagnóstico precoce para prevenir o agravamento dos casos e a infecção de animais saudáveis, logo, a detecção qualitativa do FIV e/ou FeLV por PCR em tempo real tem grande importância por ser um método sensível, preciso e ágil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
2. Hofmann-Lehmann R, Huder JB, et al. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. J Gen Virol. 2001 Jul;82(Pt 7):1589-96.
3. Morton JM, McCoy RJ, et al. Validation of real-time polymerase chain reaction tests for diagnosing feline immunodeficiency virus infection in domestic cats using Bayesian latent class models. Prev Vet Med. 2012 Apr 1;104(1-2):136-48.
4. Pinches MD, Diesel G, et al. An update on FIV and FeLV test performance using a Bayesian statistical approach. Vet Clin Pathol. 2007 Jun;36(2):141-7.
5. Tandon R, Cattori V, et al. Quantification of endogenous and exogenous feline leukemia virus sequences by real-time PCR assays. Vet Immunol Immunopathol. 2008 May 15;123(1-2):129-33.
6. Tandon R, Cattori V, et al. Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan real-time polymerase chain reaction. J Virol Methods. 2005 Dec;130(1-2):124-32

**QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda**

Rua Teles de Menezes, 92 – Santa Branca
CEP 31565-130 – Belo Horizonte – MG – Brasil
Tel.: (31) 3439.5454
E-mail: sac@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 – Indústria Brasileira

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente
Tel.: 0800 0315454
E-mail: sac@bioclin.com.br

SIMBOLOGIA UNIVERSAL

	NÚMERO DE CATÁLOGO		FABRICADO POR
	NÚMERO DO LOTE		CONTROLE
	DATA DE FABRICAÇÃO		CONTROLE POSITIVO
	DATA DE VALIDADE (último dia do mês)		CONTROLE NEGATIVO
	LIMITE DE TEMPERATURA (conservar a)		RISCO BIOLÓGICO
	O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTE		INFLÂMVEL
	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CORROSIVO
	PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PROTEGER DA LUZ E CALOR		NÃO UTILIZAR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA
	NÃO REUTILIZE		PRODUTO ESTERELIZADO
	CUIDADO		PERIGO



Bioclin · QUIBASA

 Rua Teles de Menezes, 92 . Belo Horizonte . MG . Brasil . CEP: 31565-130
Tel +55 31 3439 5454 . www.bioclin.com.br
FARM. RESP. Sílvia Wandalsen Arndt - CRF MG 7422
C.N.P.J.: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira