



BVDV PCR

Instruções de uso

REF G175-4

Revisão: Janeiro/2026

Biodin · 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	5
Amostras	6
Procedimento	6
A. Extração do RNA	6
B. Preparo dos Reagentes	7
C. Diluição dos Padrões Quantitativos.....	7
D. Preparo da PCR.....	8
E. Definições do termociclador para a PCR em Tempo Real	9
F. Validação do Resultado	9
G. Interpretação do resultado.....	10
Limitações do Processo	11
Sensibilidade Analítica	11
Significado Clínico	12
Referências Bibliográficas	13
Atendimento ao Consumidor	13
Simbologia Universal	15

FINALIDADE

Teste para detecção quantitativa do RNA do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) 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 BVDV PCR é um ensaio *in vitro* baseado na detecção quantitativa do RNA do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) através da RT - PCR em tempo real. O método de Transcrição Reversa seguida da PCR em Tempo Real é usado para amplificar o RNA do vírus. Um termociclador de PCR em Tempo Real é usado para amplificar e detectar as sondas fluorescentes específicas para cada patógeno. O software do aparelho detecta a presença ou ausência dos patógenos.

Reagente	Apresentação
	Bio Gene Vet BVDV 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 110 µL*
R8	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, Transcriptase Reversa, dNTPs, MgCl₂, Estabilizantes.

R3. Tampão Mix: TRIS-HCl.

R4. Padrão A (2 x 10⁶ cópias/μL) : Plasmídeo, TRIS-HCl, EDTA.

R5. Diluente: TRIS-HCl, EDTA.

R6. Água: Água livre de DNase/RNase.

R7. Solução PCR Cl: Primer, Sonda, TRIS-HCl.

R8. Controle interno: Plasmídeo, TRIS-HCl, EDTA.

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 centrífuga de 1,5 mL;
- 4- Tubos ou placas para PCR;
- 5- Luvas de látex descartáveis livres de pó ou material similar;
- 6- Microcentrífuga;
- 7- Vórtex;
- 8- Micropipetas e ponteiros estéreis com filtro (0,5-10 μL, 10-100 μL, 100-1000 μL);
- 9- Kit para extração de ácidos nucleicos;

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento é de -20°C (-10°C 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°C a 8°C por 5 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. Evitar 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 nucleicos, transcrição reversa, amplificação e detecção requerem pessoal qualificado para evitar o risco de resultados errados, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos 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

Sangue total (EDTA), soro ou buffy coat (capa de leucócitos), swab nasal e oral/orofaríngeo, secreções respiratórias em geral, fezes/swab retal, leite/colostró, sêmen, biópsia de orelha (ear notch) e tecidos (linfonodos, timo, intestino, pulmão, fígado, baço, rim, cérebro, feto e placenta).

Nota: A seleção da amostra no diagnóstico de BVDV deve acompanhar o quadro clínico e o objetivo do exame. Em infecções agudas com sinais respiratórios ou entéricos, sangue total, secreções respiratórias ou fezes são mais indicados; em abortos, tecidos fetais e placenta aumentam a chance de detecção; já para rastreio de animais persistentemente infectados (PI), sangue, biópsia de orelha, leite ou tecidos linfóides são matrizes preferenciais. Amostras que não refletem a via principal de eliminação ou o estágio da infecção elevam o risco de falsos negativos. Dessa forma, correlacionar sinais clínicos, histórico reprodutivo e tipo de amostragem é essencial para maximizar a sensibilidade do teste e obter um diagnóstico confiável de BVDV. As amostras devem ser coletadas de acordo com as recomendações do laboratório para testes moleculares. Devem ser transportadas e armazenadas entre 2°C 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 (R8)** deve ser preparado (vide item B.4) e adicionado às amostras durante a extração, conforme descrito abaixo:

1- Adicionar 5 µL do **Controle Interno (R8)** 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 (R8)** diretamente à amostra biológica pura, pois pode resultar em degradação do mesmo.

B. Preparo dos reagentes

Os reagentes R4 e R8 contém molde de RNA, e devem ser manipulados (ressuspendidos) em área apropriada para evitar a contaminação dos demais reagentes.

- 1- Centrifugar (pulso spin) os reagentes **Solução PCR (R1)**, **Solução PCR CI (R7)**, **Padrão A (R4)** e **Controle Interno (R8)** antes da abertura dos microtubos.
- 2- Ressuspender 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 os reagentes **Solução PCR (R1)** e **Solução PCR CI (R7)** com 110 µL do reagente **Água (R6)**
- 4- Ressuspender os reagentes **Padrão A (R4)** e **Controle Interno (R8)** com o reagente **Diluyente (R5)** de acordo com a tabela abaixo

Reagente	Apresentação
	100 Testes
Padrão A (R4)	500 µL
Controle Interno (R8)	500 µL

C. Diluição dos Padrões Quantitativos

- 1- Ressuspender o **Padrão A (R4)** com 500 µL do **Diluyente (R5)**.
- 2- Separar 3 microtubos (não fornecidos no kit) adequados para a diluição seriada do **Padrão A (R4)**.
- 3- Pipetar 90 µL do **Diluyente (R5)** em cada microtubo e nomeá-los como B, C e D respectivamente.
- 4- Em seguida, pipetar 10 µL do **Padrão A (R4)** no microtubo B e homogeneizar.
- 5- Trocar a ponteira e pipetar 10 µL do microtubo B no microtubo C e homogeneizar.
- 6- Trocar a ponteira e pipetar 10 µL do microtubo C no microtubo D e homogeneizar.

7- No final da diluição temos padrões A, B, C, e D, com as seguintes concentrações:

Padrão A – 2×10^5 cópias/ μ L

Padrão B – 2×10^4 cópias/ μ L

Padrão C – 2×10^3 cópias/ μ L

Padrão D – 2×10^2 cópias/ μ L

D. Preparo da PCR

1- Separar previamente os microtubos/poços a serem utilizados, de acordo com o número de amostras e controles 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)	10 μ L	250 μ L	500 μ L	1mL
Solução PCR (R1)	1 μ L	25 μ L	50 μ L	100 μ L
Solução PCR CI (R7)	1 μ L	25 μ L	50 μ L	100 μ L

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 12 μ L da solução de PCR final nos tubos ou poços determinados para as reações.

4- Adicionar 8 μ L do RNA extraído da amostra ou 8 μ L do **Padrão A(R4)** ou 8 μ L de **Água (R6)**, usada como controle negativo.

5- Homogeneizar bem.

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

7- Homogeneizar bem.

8- Transporte os tubos/placa para o termociclador.

E. 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 Quantitativo.

2- Defina os detectores (sondas) fluorescentes como:

OBS: Equipamentos que utilizam o ROX como referência passiva devem ser programados com a opção "NONE" para referência passiva.

Alvo	Detector	Quencher
Controle Interno	VIC/HEX	NFQ-MGB
BVDV	FAM	

OBS:

- O Padrão A não apresenta o Controle Interno (VIC/HEX), pois o mesmo é utilizado para o controle da extração e da amplificação das amostras.
- As amostras extraídas devem ser marcadas com os detectores FAM e VIC/HEX.

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 (60-0:60)".

F. Validação do Resultado

1- Controles

Controles	Faixa permitida CT	Amplificação/Deteção
Positivo FAM	Presença de amplificação	Válida
Negativo	Indeterminado	Válida
Interno VIC/HEX	$CT \leq 35$	Válida

G. Interpretação do resultado

Curva padrão	Faixa permitida	Amplificação/Deteção
Coeficiente de correlação (R^2)	$0,99 \leq R^2 \leq 1,00$	Válida

Se o valor de R^2 não ficar entre os limites da faixa permitida, o resultado é considerado inválido e o teste deve ser repetido.

Vírus do BVDV		Resultado	Deteção
FAM	VIC		
Presença de amplificação ou Concentração determinada	$CT \leq 35$	Positivo	Válida
	$CT > 35$	Positivo	Inválida*
Ausência de amplificação ou Concentração indeterminada	$CT \leq 35$	Negativo	Válida
	$CT > 35$	Negativo	Inválida*

***OBS:** Os valores de CT do Controle Interno variam de acordo com as condições do processo, como a eficiência da extração do RNA/DNA, 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 RNA/DNA 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.

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

O software do termociclador calcula automaticamente a concentração das amostras.

Exemplo: Se o programa mostrar uma concentração como 2.00E+005, então a concentração da amostra será 2.0×10^5 cópias/ μL .

Resultado da Amostra em cópias/ μL (FAM)	Cópias por reação
$\geq 1 \times 10^5$	$\geq 1.000.000$
$2 \leq \text{Quantidade} \leq 9 \times 10^5$	Quantidade obtida
< 2	< 10

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 responsável.

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 8 μL 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

A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é uma das principais causas de doença sistêmica em bovinos, acometendo trato digestório, sistema respiratório e aparelho reprodutor. Animais infectados podem apresentar diarreia persistente, fezes com sangue ou muco, erosões de mucosa oral, febre, perda de condição corporal e queda na produção de leite. Quando a infecção ocorre durante a gestação, são frequentes aborto, natimortalidade, malformações congênitas e, sobretudo, o nascimento de bezerras persistentemente infectadas (PI), que permanecem virêmicas e eliminando BVDV por toda a vida. Do ponto de vista epidemiológico, o BVDV é peça central em programas sanitários por atuar como imunossupressor importante e componente do complexo respiratório bovino (BRDC), favorecendo infecções secundárias e aumentando morbidade, mortalidade e descarte precoce em sistemas de leite e corte. Animais PI eliminam grandes quantidades de vírus em secreções nasais e oculares, fezes, urina, leite/colostró e sêmen, o que sustenta a circulação do agente no rebanho e dificulta sua erradicação. Nesse contexto, o diagnóstico rápido e preciso é fundamental tanto para casos clínicos quanto para triagens de rebanho. Métodos como isolamento viral e testes sorológicos (ELISA, soroneutralização) são úteis, mas podem ser lentos, exigir infraestrutura complexa ou falhar na detecção precoce da infecção e na diferenciação entre animais apenas vacinados e animais infectados. A PCR em tempo real (RT-qPCR) se destaca pela alta sensibilidade, especificidade e capacidade de detectar o RNA viral em diferentes matrizes, mesmo quando o vírus já foi inativado ou em amostras de baixa carga viral, como aerossóis, fezes e sangue. Para atender a essas demandas, o Bio Gene Vet BVDV PCR oferece uma solução moderna, robusta e validada para a detecção direta do BVDV em múltiplas matrizes clínicas e ambientais, apoiando o diagnóstico de casos agudos, a identificação de animais PI e o monitoramento de rebanhos. O kit é indicado para laboratórios veterinários que buscam rapidez, confiabilidade e padronização no diagnóstico de BVDV, contribuindo para programas de vigilância, controle e tomada de decisão sanitária em propriedades leiteiras e de corte.

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- OIE/WOAH. Diagnosis of bovine viral diarrhea virus: an overview of currently available methods. Revista Científica e Técnica da Organização Mundial de Saúde Animal (Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.), 2019.
- 3- WALZ, P. H. et al. Bovine viral diarrhea virus: an updated American College of Veterinary Internal Medicine consensus statement with focus on virus biology, hosts, immunosuppression, and vaccination. Journal of Veterinary Internal Medicine, v. 34, p. 1690–1707, 2020.

**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		INFLÁMVEL
	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

BIO GENÉ VET

Bioclin · QUIBASA

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. Silvio Wandalsen Arndt - CRF MG 7422

C.N.P.J.: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira
