



BoHV-1 PCR

Instruções de uso

REF G176-4

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 DNA	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	8
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 DNA do Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1) em amostras biológicas através da reação em cadeia da polimerase (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 do Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1)** é um ensaio *in vitro* baseado na detecção quantitativa do DNA do BoHV-1 através da PCR em tempo real. O método de PCR em Tempo Real é usado para amplificar o DNA do patógeno. 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 BoHV-1PCR
	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, 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 ponteiros com filtro. As ponteiros empregadas devem ser estéreis, livres de DNases e RNases.
- 7- Evitar o congelamento e descongelamento repetido dos reagentes.
- 8- Armazenar as amostras de DNA 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

Swab nasal, ocular/conjuntival, orofaríngeo/traqueal, vulvar/vaginal, prepucial/peniano, secreções respiratórias em geral, sêmen, tecidos (pulmão, fígado, baço, rim, cérebro, feto e placenta).

Nota: A seleção da amostra no diagnóstico de BoHV-1 deve acompanhar os sinais clínicos, já que o vírus é eliminado principalmente por vias respiratórias e genitais. Coletas que não correspondem ao local de manifestação, como swabs respiratórios em quadros reprodutivos ou vice-versa, aumentam o risco de falso-negativos. Por isso, alinhar quadro clínico e amostragem é essencial para maximizar a sensibilidade do teste e obter um diagnóstico confiável de Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR).

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 DNA adequadas à amplificação por PCR com pureza e concentração adequadas. Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido.

PROCEDIMENTO

A. Extração do DNA

Os ácidos nucleicos (DNA) 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 DNA, e devem ser manipulados (ressuspensos) 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/µL

Padrão B – 2×10^4 cópias/ μL

Padrão C – 2×10^3 cópias/ μL

Padrão D – 2×10^2 cópias/ μL

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 μL	250 μL	500 μL	1mL
Solução PCR (R1)	1 μL	25 μL	50 μL	100 μL
Solução PCR Cl (R7)	1 μL	25 μL	50 μL	100 μL

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 μL da solução de PCR final nos tubos ou poços determinados para as reações.

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

5- Homogeneizar bem.

6- Observe que o volume total da reação é de 20 μL , 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
BoHV-1	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	95°C	3 minutos	1
2	95°C	15 segundos	45
	60°C	60 segundos	

Defina “Data Collection” como “stage 2, 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	$25 \leq CT \leq 35$	Válida
-----------------	----------------------	--------

Obs: Os valores de CT do Controle Interno variam de acordo com as condições do processo, como a eficiência da extração do 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 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.

G. Interpretação do resultado

Curva padrão	Faixa permitida	Amplificação/ Detecção
Coefficiente 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 BoHV-1		Resultado	Detecção
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 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 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/ μ L.

Resultado da Amostra em cópias/ μ L (FAM)	Cópias por reação
$\geq 1 \times 10^6$	$\geq 1.000.000$
$2 \leq \text{Quantidade} \leq 9 \times 10^5$	Quantidade obtida
< 2	< 10

A não detecção do DNA 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 μ L do produto de extração de DNA 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 Bovine Herpesvirus Type 1 (BoHV-1) é responsável por quadros respiratórios, reprodutivos e oculares que compõem a síndrome conhecida como IBR. O vírus apresenta elevada capacidade de disseminação, causando surtos caracterizados por febre, corrimento nasal seroso a mucopurulento, tosse, queda na produção de leite, conjuntivite e, em animais gestantes, aborto. Também desencadeia vulvovaginite pustular em vacas e balanopostite em touros, impactando diretamente a fertilidade. Um dos maiores desafios sanitários é a capacidade do BoHV-1 de estabelecer latência nos gânglios nervosos, reativando-se em situações de estresse e perpetuando a infecção no rebanho. Do ponto de vista epidemiológico, o BoHV-1 é um dos principais agentes do complexo respiratório bovino, contribuindo para aumento de morbidade, mortalidade, descarte precoce e perdas produtivas. Em rebanhos leiteiros e de corte, a infecção tem impacto expressivo na economia, e sua circulação silenciosa dificulta ações de controle. Nesse contexto, o diagnóstico rápido e preciso é fundamental. Métodos convencionais, como isolamento viral ou testes sorológicos, apresentam limitações, especialmente na fase aguda ou em fetos autolisados. A PCR em tempo real destaca-se por sua alta sensibilidade, especificidade e capacidade de detectar o vírus mesmo quando a viabilidade viral está comprometida. Além disso, permite diferenciar animais verdadeiramente infectados de respostas vacinais, identificar portadores e confirmar abortos atribuíveis ao BoHV-1. Para atender a essas demandas, o Bio Gene Vet BoHV-1 PCR oferece uma solução moderna, robusta e validada para a detecção direta do DNA do BoHV-1 em múltiplas matrizes clínicas. O kit é indicado para laboratórios veterinários que buscam rapidez, confiabilidade e suporte ao diagnóstico de IBR, contribuindo para programas de vigilância, controle e tomada de decisão sanitária no rebanho.

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. BARTHA, A. et al. Improved antigenic methods for differential diagnosis of bovine, caprine, and cervine alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. Archiv für die gesamte Virusforschung, v. 56, p. 381–390, 1978.
3. DIMA, A.; ABDISA, T. Diagnostic techniques for infectious bovine rhinotracheitis: a review. Journal of Veterinary Medicine and Animal Health, v. 11, n. 10, p. 180–187, 2019.

**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



Bioclin · QIBASA



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
