

# BIO GENE VET

Bioclin · QUIBASA

## FCoV PCR

### *Instruções de uso*

---

**REF** VET097

Revisão: Janeiro/2026

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.....	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 .....	7
E . Definições do termociclador para a PCR em Tempo Real .....	8
F . Validação do Resultado .....	10
G . Interpretação do resultado .....	11
Limitações do Processo.....	11
Sensibilidade Analítica.....	11
Significado Clínico.....	11
Referências Bibliográficas.....	12
Atendimento ao Consumidor.....	13
Simbologia Universal.....	14

## FINALIDADE

Teste para detecção quantitativa do RNA do Coronavírus Felino (FCoV) em amostras biológicas através da Transcrição Reversa seguida da PCR em Tempo Real. Produto desenvolvido para diagnóstico molecular veterinário *in vitro*. O uso deve ser restrito a profissionais qualificados e conforme as legislações e normas técnicas aplicáveis.

## PRINCÍPIO DE AÇÃO

O kit **Bio Gene Vet FCoV PCR** é um ensaio *in vitro* baseado na detecção quantitativa do RNA do FCoV através da RT-PCR em tempo real.

O método de RT-PCR em Tempo Real é usado para amplificar o RNA do patógeno. Um termociclador de PCR em Tempo Real é usado para amplificar e detectar a sonda fluorescente. O software do aparelho calcula a concentração de RNA do patógeno expressa em cópias/ $\mu\text{L}$ , utilizando a curva padrão gerada a partir do padrão quantitativo contido no kit.

## APRESENTAÇÃO

Reagente	Apresentação	
	Bio Gene Vet FCoV PCR	
	50 Testes	100 Testes
<b>R1</b>	1 x 55 $\mu\text{L}$	1 x 110 $\mu\text{L}$
<b>R2</b>	1 x 500 $\mu\text{L}$	1 x 1,0 mL
<b>R3</b>	1 x 55 $\mu\text{L}$	1 x 110 $\mu\text{L}$
<b>R4</b>	1 x 250 $\mu\text{L}$	1 x 500 $\mu\text{L}$
<b>R5</b>	1 x 750 $\mu\text{L}$	1 x 1,5 mL
<b>R6</b>	1 x 750 $\mu\text{L}$	1 x 1,5 mL
<b>R7</b>	1 x 250 $\mu\text{L}$	1 x 500 $\mu\text{L}$
<b>R8</b>	1 x 20 $\mu\text{L}$	1 x 40 $\mu\text{L}$

## REAGENTES

- R1. Solução PCR:** Primer, Sonda, TRIS-HCl.
- R2. Mix Taq:** Polimerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Estabilizantes.
- R3. Solução PCR CI:** Primer, Sonda, TRIS-HCl.
- R4. Padrão A (2 x 10<sup>5</sup> cópias/μL):** Plasmídeo, TRIS-HCl, EDTA.
- R5. Diluente:** TRIS-HCl, EDTA.
- R6. Água:** Água livre de DNase/RNase.
- R7. Controle Interno:** Plasmídeo, TRIS-HCl, EDTA.
- R8. Transcriptase Reversa:** Transcriptase Reversa, Estabilizantes.

## EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

### Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no quadro anterior.
- Instruções 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 e transporte é de -20°C (-10 a -30°C). Evite realizar mais de cinco ciclos de congelamento e descongelamento dos reagentes. Caso seja necessária uma utilização mais frequente, recomenda-se a aliquotagem dos reagentes para preservar sua estabilidade e desempenho. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

## **CUIDADOS ESPECIAIS**

**1-** Produto desenvolvido para diagnóstico molecular veterinário *in vitro*. O uso deve ser restrito a profissionais qualificados e conforme as legislações e normas técnicas 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 reações.

**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 RNA a -20°C, caso não sejam 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](http://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 pode ser utilizado com amostras de RNA extraídas de fezes, swab retal, efusões (líquido ascítico, pleural ou pericárdico), sangue total (EDTA), plasma, líquido, humor aquoso e tecidos de órgãos afetados.

O ensaio de PCR em tempo real deste kit detecta regiões conservadas do genoma do coronavírus felino (FCoV), permitindo identificar o vírus em variantes entéricas comuns e mutações que podem resultar na forma sistêmica conhecida como peritonite infecciosa felina (PIF), sem distinção entre variantes.

Para o diagnóstico de infecção entérica, recomenda-se utilizar fezes frescas ou swabs retais, devido à alta eliminação viral pelo trato intestinal.

Em suspeita de PIF, priorizar efusões (ascítica, pleural ou pericárdica), que apresentem maior carga viral. Na ausência dessas amostras, podem ser utilizados sangue total (EDTA), plasma, líquido, humor aquoso ou tecidos afetados (fígado, rim, linfonodo ou cérebro). A detecção de RNA viral em amostras extraintestinais é sugestiva de infecção por variante mutante do FCoV associada à PIF, devendo o resultado ser interpretado em conjunto com os achados clínico-patológicos e laboratoriais.

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 dias<sup>1</sup>. Utilizar amostras de RNA com pureza e concentração adequadas para amplificação por PCR. Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido.

## PROCEDIMENTO

### A. Extração do RNA

Os ácidos nucleicos (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) e adicionado às amostras durante a extração, conforme descrito abaixo:

- 1- Adicionar 5 µL 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** contêm molde de DNA/RNA e devem ser manipulados em área apropriada para evitar a contaminação dos demais reagentes.

- 1- Centrifugar (pulso spin) os reagentes **Solução PCR (R1)**, **Solução PCR CI (R3)**, **Padrão A (R4)** e **Controle Interno (R7)** antes da abertura dos microtubos.
- 2- O **Mix Taq (R2)** não contém fluoróforo de referência passiva (ROX).

## **C. Diluição dos Padrões Quantitativos\***

- 1- Separar 3 microtubos (não fornecidos no kit) adequados para a diluição seriada do **Padrão A (R4)**.
- 2- Pipetar 90  $\mu\text{L}$  do **Diluyente (R5)** em cada microtubo e nomeá-los como B, C e D respectivamente.
- 3- Em seguida, pipetar 10  $\mu\text{L}$  do **Padrão A (R4)** no microtubo B e homogeneizar.
- 4- Trocar a ponteira e pipetar 10  $\mu\text{L}$  do microtubo B no microtubo C e homogeneizar.
- 5- Trocar a ponteira e pipetar 10  $\mu\text{L}$  do microtubo C no microtubo D e homogeneizar.
- 6- No final da diluição temos padrões A, B, C e D com as seguintes concentrações:

Padrão A –  $2 \times 10^5$  cópias/ $\mu\text{L}$

Padrão B –  $2 \times 10^4$  cópias/ $\mu\text{L}$

Padrão C –  $2 \times 10^3$  cópias/ $\mu\text{L}$

Padrão D –  $2 \times 10^2$  cópias/ $\mu\text{L}$

*\*A diluição da curva padrão deve ser realizada para o teste quantitativo.*

## **D. 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/ Teste	25 Reações/ Testes	50 Reações/ Testes	100 Reações/ Testes
Mix Taq (R2)	10 µL	250 µL	500 µL	1 mL
Solução PCR (R1)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Transcriptase Reversa (R8)	0,4 µL	10 µL	20 µL	40 µL
Solução PCR Cl (R3)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Água (R6)	2,6 µL	65 µL	130 µL	260 µL

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

- 3- Pipetar 15 µL da solução de PCR final nos tubos ou poços determinados para as reações.
- 4- Adicionar 5 µL do RNA extraído da amostra ou 5 µL do Padrão Quantitativo ou 5 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 ou Padrões Quantitativos).
- 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 com Curva Padrão ou Teste Qualitativo.

**OBS.:** No caso do teste qualitativo, o **Padrão A (R4)** pode ser utilizado como Controle Positivo de amplificação.

**2- Defina os detectores (sondas) fluorescentes como:**

Alvo	Detector	Quencher
FCoV	FAM	NFQ-MGB
Controle Interno	VIC	

**OBS.:**

- Os Padrões Quantitativos não apresentam o Controle Interno (VIC), 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.

**3- Defina os Padrões Quantitativos (Standards) como\*:**

Padrão A –  $2 \times 10^5$  cópias/ $\mu$ L

Padrão B –  $2 \times 10^4$  cópias/ $\mu$ L

Padrão C –  $2 \times 10^3$  cópias/ $\mu$ L

Padrão D –  $2 \times 10^2$  cópias/ $\mu$ L

*\*Programação utilizada no teste quantitativo.*

**4- 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°C - 0:60)".

## F. Validação do Resultado

### 1- Curva padrão

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.

### 2- Amostras

FCoV PCR		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 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 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.

## G. Interpretação do resultado

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  $2.0 \times 10^5$  cópias/ $\mu$ L.

Resultado da Amostra em cópias/ $\mu$ L (FAM)	Cópias por reação
$\geq 1 \times 10^6$	> 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 1  $\mu$ L 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

O coronavírus felino (*Feline Coronavirus* – FCoV) é amplamente disseminado entre gatos, especialmente em ambientes com alta densidade populacional, como abrigos, gatis e lares com múltiplos animais. A infecção entérica, causada pelo coronavírus entérico felino (FECV), é a forma mais comum e geralmente resulta em quadros subclínicos ou em diarreia leve e autolimitante. Em alguns gatos, entretanto, o vírus

pode sofrer alterações que permitem sua disseminação sistêmica, com replicação em monócitos e macrófagos, levando ao desenvolvimento de sinais compatíveis com a peritonite infecciosa felina (PIF). Essa forma clínica é caracterizada por febre persistente, perda de peso, letargia, efusões cavitárias e, em alguns casos, sinais neurológicos ou oculares.

Embora mutações específicas no gene da espícula (*spike*) tenham sido associadas a variantes detectadas em gatos com PIF, os estudos atuais mostram que tais alterações também podem estar presentes em infecções não associadas à doença. Assim, o papel dessas mutações na patogênese ainda não está completamente elucidado, e sua detecção isolada não é considerada um critério confiável para o diagnóstico de PIF.

O Bio Gene Vet FCoV PCR é um teste molecular *in vitro* baseado na reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) para detecção qualitativa do RNA do coronavírus felino. O ensaio não diferencia entre os biotipos entérico (FECV) e mutante (FIPV), o que reflete o entendimento atual de que o diagnóstico mais preciso é obtido pela detecção do FCoV total, associada à interpretação clínica e ao tipo de amostra analisada. A presença de RNA viral em fezes indica infecção entérica ou eliminação por portadores assintomáticos, enquanto a detecção em efusões cavitárias, sangue total, líquido, humor aquoso ou tecidos está relacionada à disseminação sistêmica e reforça a suspeita clínica de PIF.

Dessa forma, a abordagem mais adequada para o diagnóstico molecular da PIF é a utilização de um teste de RT-qPCR de ampla detecção, como o Bio Gene Vet FCoV PCR, aplicado à amostra mais compatível com o quadro clínico do paciente. Essa estratégia garante alta sensibilidade e especificidade, contribuindo de forma confiável para a avaliação e manejo dos casos suspeitos de infecção por coronavírus felino.

## 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. Barker EN, Stranieri A, Helps CR, et al. Limitations of using feline coronavirus spike protein gene mutations to diagnose feline infectious peritonitis. *Veterinary Research*, 2017.
3. Felten S, Leutenegger CM, Balzer H-J, et al. Sensitivity and specificity of a real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction detecting feline coronavirus mutations in effusion and serum/plasma of cats to diagnose feline infectious peritonitis. *BMC Veterinary Research*, 2017.

4. Felten S, Hartmann K. Diagnosis of feline infectious peritonitis: A review of the current literature. *Viruses*, 2019.
5. Pedersen NC. An update on feline infectious peritonitis: Diagnostics and therapeutics. *The Veterinary Journal*, 2014.
6. Sharif S, Arshad SS, Hair-Bejo M, et al. Diagnostic methods for feline coronavirus: A review. *Veterinary Medicine International*, 2010.

**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](mailto: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](mailto: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 GENE 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](http://www.bioclin.com.br)

FARM. RESP. Sílvia Wandalsen Arndt - CRF MG 7422

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