

**CONJUNTO DE PRIMERS E SONDAS PARA DETECÇÃO DE VÍRUS DA DIARRÉIA BOVINA
BVD I/FAM, BVD I e II/HEX, BVD III/ROX E CI/CY5 - RUO
BVDMULT-50**

Instruções de Uso

1. NOME COMERCIAL

Conjunto de primers e sondas para detecção de Vírus da Diarreia Bovina - BVD I /FAM, BVD I e II/HEX, BVD III/ROX e CI/Cy5 – RUO – 50 reações.

2. FINALIDADE DO TESTE

O conjunto de reagentes é utilizado para a detecção de sequências do RNA do Vírus da Diarreia Bovina - BVD I, BVD II e BVD III a partir de amostras biológicas submetidas a métodos de extração e purificação de RNA.

Uso exclusivo em pesquisa (RUO).

3. PRINCÍPIO DO TESTE

A técnica de PCR em Tempo Real (qPCR) permite determinar a presença da sequência alvo de RNA, 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.

4. TIPOS DE AMOSTRAS, CONDIÇÕES PARA COLETA, MANUSEIO, PREPARO E PRESERVAÇÃO

Amostras biológicas com suspeita da presença do Vírus da Diarreia Bovina - BVD I, BVD II e BVD III. O material coletado deve ser armazenado de 4 a 8°C por até 48h, -20°C por até 30 dias ou -70°C por tempo indeterminado. Para realização do teste as amostras devem ser submetidas ao processo de extração de RNA de escolha do operador. O material genético extraído deve ser conservado de 4 a 8 °C por até 12h, -20 °C por até 30 dias ou -80 °C por tempo indeterminado.

Nota: Não recomendamos que as amostras sejam submetidas ao processo de *pool* com risco de interferência no resultado, podendo apresentar resultados falso-negativos.

5. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

COMPONENTES 50 Reações	DESCRIÇÃO	QUANTIDADE	VOLUME
2X Tampão de reação RT-qPCR	Mistura para qPCR	1 frasco	1,0 mL
Primers e Probes <i>Vírus da Diarreia Bovina</i> - BVD I /FAM, BVD I e II/HEX, BVD III/ROX e CI/Cy5	Oligonucleotídeos e Sondas Fluorescentes	1 frasco	100 µL
Enzima RT-qPCR	Mix de Enzimas	1 frasco	50 µL
Água ultrapura	Água ultrapura DNase e RNase Free	1 frasco	1,0 mL

Controle Positivo 250.000 cópias/reação	Controle positivo Sintético para <i>Vírus da Diarreia Bovina</i> - BVD I, BVD II e BVD III	1 frasco	100 µL
--	--	----------	--------

Tabela 1. Componentes do kit de amplificação

6. EQUIPAMENTOS, REAGENTES 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/HEX/ROX/Cy5).

Insumos: Microtubos de 0,2, 1,0 a 2 mL, ponteiros 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.

*Importante trabalhar com equipamentos em boas condições de uso e com manutenções preventivas em dia.

7. ESPECIFICAÇÃO DE DESEMPENHO

- Limitação de detecção: 25 cópias/reação
- Sensibilidade: 25 cópias/reação
- Especificidade: NA
- Reação Cruzada: NA

8. PROCEDIMENTO

8.1. Preparo do MIX

- 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.
- Para amostras: Adicione 5µL da respectiva amostra ao poço contendo o mix da reação. Homogeneíze com auxílio de uma pipeta.
- Para o controle positivo: Adicione 5µL do Controle Positivo em um poço contendo o mix da reação. Homogeneíze com auxílio de uma pipeta.
- Para o controle negativo: Adicione 5µL de água ultrapura em um 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.

Observação³ - Dar spin nos tubos antes de utilizá-los.

	Volume por reação
2X Tampão de reação RT- qPCR	10,0 µL
Primers e Probes <i>para detecção de Vírus da Diarreia Bovina - BVD I /FAM, BVD I e II/HEX, BVD III/ROX e CI/Cy5</i>	2,0 µL
Enzima RT-qPCR	1,0 µL
Água	2,0 µL
Volume total do mix	15 µL
Controle Positivo ou Amostra	5,0 µL
Volume final de reação	20,0 µL

Tabela 2. Preparo do Mix de reação

8.2. Configuração do equipamento

Defina os canais de fluorescência e programe o *termociclador*, de acordo com as instruções do fabricante. O volume total da reação é de 20µL, um controle positivo e um negativo são necessários para cada ensaio, independentemente da quantidade de amostras processadas.

O equipamento deve ser configurado em 3 etapas, conforme descrito na Tabela 3:

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	55°C	30 minutos	1
2	95°C	2 minutos	1
3	95°C	15 segundos	40
	55°C*	60 segundos	

Tabela 3. Programa de ciclagem

* selecionar a leitura da fluorescência na etapa 2 – 55 °C.

**desativar a opção “Referência Passiva” no equipamento.

Canais de detecção do setup de Programas de fluorescências:

Alvo	Fluoróforo
Vírus da diarreia bovina - BVD I	FAM
Vírus da diarreia bovina - BVD I e II	HEX
Vírus da diarreia bovina - BVD III	ROX
Controle interno (CI)	Cy5

Tabela 4. Canais de detecção

9. INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

As amostras que apresentarem sinal de fluorescência, isto é, amplificação para o alvo no canal de fluorescência FAM, HEX ou ROX com Ct igual ou abaixo de 37 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, HEX ou ROX e apresentarem um valor de Ct do controle interno (CI) no canal de fluorescência CY5 entre 15 e 37, serão consideradas negativas para a detecção do respectivo alvo.

O resultado do teste será considerado **NÃO DETECTADO OU NEGATIVO**.

As amostras que **NÃO** apresentarem sinal de fluorescência, isto é, não amplificarem para o alvo no canal de fluorescência FAM, HEX ou ROX e **NÃO** apresentarem um valor de Ct do controle interno (CI) no canal de fluorescência Cy5, serão consideradas inválidas para a detecção do respectivo alvo.

O resultado do teste será considerado **INVÁLIDO** e o teste deverá ser repetido com uma nova amostra.

Alvo - Valor de Ct				Resultado
BVD I (FAM)	BVD II (HEX)	BVD III (ROX)	Controle interno (Cy5)	
<37	<37	<37	Detectado ou não detectado	Positivo para BVD I ou BVD II e BVD III
<37	Não detectado	Não detectado	Detectado ou não detectado	Positivo para BVD I
Não detectado	<37	Não detectado	Detectado ou não detectado	Positivo para BVD I ou II
Não detectado	Não detectado	<37	Detectado ou não detectado	BVD III
>37 CT <40	>37 CT <40	>37 CT <40	<37	Inconclusivo*
Não detectado	Não detectado	Não detectado	<37	Negativo para BVD I, BVD II, BVD III.
Não detectado	Não detectado	Não detectado	>37 ou não detectado	Inválido**

Tabela 5. Interpretação dos resultados

* O resultado do teste será considerado **INCONCLUSIVO**. A amostra deverá ser reextraída e amplificada. Caso apresente o mesmo resultado, esta poderá ser considerada negativa ou solicitar uma nova coleta.

** O resultado do teste será considerado **INVÁLIDO**. A amostra deverá ser reextraída e amplificada. Caso apresente o mesmo resultado, solicitar uma nova coleta.

10. FONTES POTENCIAIS DE VARIABILIDADE

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 mais de 4 vezes. Quando descongelado, manter o controle positivo em gelo, isso irá impedir a degradação. Se possível alíquotar o controle e utilize apenas quando necessário.

Tabela 6. Possíveis problemas encontrados.

11. CONTROLE INTERNO DA QUALIDADE (CIQ)

A validade do resultado do teste é comprovada pela utilização dos controles positivos e negativos.

O **Controle Negativo** de amplificação serve para garantir a especificidade da reação na detecção dos alvos e que não houve contaminação com RNA do patógeno em nenhum dos passos de preparo da placa de PCR.

A amplificação do **Controle Positivo** deverá apresentar um Ct abaixo de 37, para garantir que os reagentes utilizados são efetivos para detectar os alvos relacionados.

12. INTERFERÊNCIAS

Resíduos de fenol, clorofórmio, sais e etanol provenientes da purificação do RNA. Para tanto, recomenda-se uma padronização da eficiência de extração com elevado rendimento para evitar estes interferentes.

13. FÓRMULAS DE CÁLCULO DOS RESULTADOS COM EXEMPLOS

Não aplicável

14. INTERVALOS BIOLÓGICOS DE REFERÊNCIA

Não aplicável

15. INTERVALO REPORTÁVEL

Não aplicável

16. VALORES CRÍTICOS

Não aplicável

17. ARMAZENAMENTO, TRANSPORTE E VALIDADE

O Kit deve ser armazenado a - 20°C em freezer com degelo manual. O armazenamento em freezers modelo *frost free* pode levar a perda de reagentes.

Verificar validade e data de fabricação na caixa do produto.

18. ESTABILIDADE APÓS ABERTO

Após aberto o kit deve ser armazenado à -20 °C. Verificar validade e data de fabricação na caixa do produto.

O processo de congelamento e descongelamento do kit pode levar a degradação dos reagentes neles presentes, evitar descongelar o kit mais de 4 vezes.

19. INFORMAÇÃO DE SEGURANÇA

- Sempre que estiver trabalhando com soluções químicas e amostras biológicas, EPIs são necessários conforme normas de segurança regulamentadas.
- Depois de receber o produto verificar se a embalagem está danificada ou se há vazamento. Se houver danos ou com vazamento, usar luvas e óculos de proteção quando descartar os frascos para evitar acidentes.
- Não usar componentes danificados, pois eles podem gerar baixo rendimento.
- Sempre trocar as ponteiros entre as transferências de líquidos para evitar a contaminação cruzada.
- Não misturar componentes de kits diferentes, se não forem do mesmo produto e do mesmo lote.
- Este produto deve ser usado apenas por pessoal treinado.
- Armazenar os químicos e plásticos em condições próprias para uso em laboratório.
- Contaminações causadas pelos resíduos são raríssimas, mas não podem ser completamente descartadas. Portanto, os resíduos devem ser considerados como material infeccioso e devem ser manuseados de acordo com as normas de segurança regulamentadas.
- Caso sejam necessárias mais informações a respeito do produto, favor entrar em contato com a NOVA BIOTECNOLOGIA.

20. PRECAUÇÕES E CUIDADOS ESPECIAIS

- Utilizar somente seguindo as instruções acima indicadas;
- Abrir a embalagem o mais próximo possível no momento do uso;
- Evitar o contato direto com a pele, olhos e/ou roupas;
- Recomenda-se a utilização de luvas para aplicação do produto;
- Conservar a embalagem em local fresco e seco;
- Não reutilizar a embalagem vazia;
- Não misturar com outros produtos;
- Manter o produto em sua embalagem original.

21. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Deregt D, Loewen KG. Bovine viral diarrhoea virus: biotypes and disease. Can Vet J. 1995 Jun;36(6):371-8.

Liu C, Liu Y, Liang L, Cui S, Zhang Y. RNA-Seq based transcriptome analysis during bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection. BMC Genomics. 2019 Oct 24;20(1):774. doi: 10.1186/s12864-019-6120-4.

Wernike K, Beer M. Comparison of bovine viral diarrhoea virus detection methods: Results of an international proficiency trial. Vet Microbiol. 2024 Mar;290:109985. doi: 10.1016/j.vetmic.2024.109985. Epub 2024 Jan 11.

Informações do Fabricante**NOVA BIOTECNOLOGIA LTDA**

R. PASADENA, 235 - PARQUE INDUSTRIAL SAN JOSE

CEP: 06715-864 - COTIA/SP - BRASIL

CNPJ: 24.096.423/0001-15

RESPONSÁVEL TÉCNICO

Dr. Rafael Almeida Ferreira de Abreu

CRMV: 29772

Atendimento ao Consumidor

Tel. +55 (11) 4243-2356

www.novabiotecnologia.com.br

e-mail: assessoria@novabiotecnologia.com.br

sac@novabiotecnologia.com.br