

Protocolo de uso do conjunto de primers e sondas para a detecção do RNA Viral do Vírus da Imunodeficiência Felina - FIV (FAM) e Vírus da Leucemia Felina – FeLV (HEX) por PCR em Tempo Real

FIVFELVMULTI-50
50 reações
Transporte: -20°C

1. USO PRETENDIDO

O conjunto de reagentes é utilizado para a detecção das sequências do RNA Viral do Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e Vírus da Leucemia Felina (FeLV) a partir de amostras biológicas submetidas a métodos de extração e purificação de RNA.

2. PRINCÍPIO DO TESTE

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

3. EQUIPAMENTOS E INSUMOS NÃO FORNECIDOS

Equipamentos: *Workstation* para PCR, micropipetas calibradas de volume variável (0,5 a 1000µL), agitador tipo Vórtex, banho maria ou estufa e termociclador de PCR em Tempo Real com filtros para leitura dos fluoróforos FAM e HEX.

Insumos: Microtubos de 0,2 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.

Reagentes disponibilizados:

Componentes	Descrição	Quantidade	Volume
2X Tampão de reação RT-qPCR	Mistura de qPCR	1 frasco	1,0 mL
Primers e Probes FIV/FAM e FeLV/HEX	Oligonucleotídeos e Sondas Fluorescentes	1 frasco	200 µL
Enzima RT-qPCR	Tampão da Enzima	1 frasco	50 µL
Água	Água ultrapura DNase e RNase Free	1 frasco	1,0 mL
Controle Positivo (5 µL = 2.500.000 Cópias/mL)	CP Sintético para FIV e FeLV	1 frasco	100 µL

Tabela 1 – Reagentes utilizados na reação

4. PREPARO DA AMOSTRA

O RNA deve ser extraído usando kit de extração de ácido nucléico, de acordo com as instruções do fabricante.

A reação de PCR realiza a detecção do RNA Viral simultaneamente. Para garantir que a amostra de interesse amplifique apenas o RNA Viral, recomenda-se o pré-tratamento da amostra com DNase (previamente ao processo de amplificação) para eliminação de vestígios de DNA.

O RNA extraído deve ser armazenado em gelo ou à 4 °C, até momento do uso, ou a -20°C para armazenamento em longos períodos.

5. REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

- 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.
- Adicione 5µL da amostra ao poço contendo o mix da reação.
- Adicione 5µL do Controle Positivo em um diferente 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.

Reação 1	
2X Tampão de reação RT-qPCR	10,0 µL
Primers e Probes FIV/FAM e FeLV/HEX	4,0 µL
Enzima RT-qPCR	1,0 µL
Controle Positivo ou Amostra	5,0 uL
Volume final de reação	20,0 µL

Tabela 2 – Preparo do Mix de reação.

6. CONFIGURAÇÃO DO EQUIPAMENTO DE PCR EM TEMPO REAL

Defina os canais de fluorescência e programe o *termociclador*, de acordo com as instruções do fabricante. O volume total da reação é de 20uL, 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*	45 segundos	

* leitura da fluorescência na etapa 3 - 55 °C

**desativar a opção "Referência Passiva" no equipamento.

Tabela 3 – Programa de ciclagem

Canais de detecção do setup de Programas de fluorescências:

Alvo	Fluoróforo
Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV)	FAM
Vírus da Leucemia Felina (FeLV)	HEX

Tabela 4 – Canais de detecção

7. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

As amostras que apresentarem sinal de fluorescência, isto é, amplificação para o alvo no canal de fluorescência **FAM** e/ou **HEX** com Ct abaixo de 40 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** e/ou **HEX**, serão consideradas negativas para a detecção do respectivo alvo.

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

Alvo	Resultado Ct (fluoróforo)	Interpretação
FIV (FAM)	<40 (FAM)	Positivo para FIV
FIV (FAM)	ND (FAM)	Negativo para FIV
FeLV (HEX)	<40 (HEX)	Positivo para FeLV
FeLV (HEX)	ND (HEX)	Negativo para FeLV

Tabela 5 – Interpretação dos resultados

8. POSSÍVEIS PROBLEMAS ENCONTRADOS

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 o várias vezes. Quando descongelado, manter o controle positivo em gelo, isso irá impedir a degradação. Se possível aliquotar o controle e utilize apenas no uso.

9. FONTES POTENCIAIS DE VARIABILIDADE

Pipetagem, calibração de pipetas e qualidade do RNA extraído.

10. 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.