



PCRRun™

Kit para Detecção Molecular de DNA

do Vírus da Leucemia Felina (FeLV)

Somente para uso Veterinário e *In vitro*

SKU30FLV104

Instruções de uso

FINALIDADE

O kit contém todos os componentes requeridos para executar o teste de forma rápida e simples.

PRINCÍPIO

O PCRRun® é usado para detecção qualitativa do Vírus da Leucemia Felina (FeLV) isolado de sangue total, swab oral, faringe e conjuntiva de felinos. Este kit foi desenvolvido para ser usado com DNA extraído por meio do kit de extração de DNA PCRRun® **30PRE104** e um bloco de aquecimento compatível.

ESTOCAGEM E MANUSEIO

- Conservar entre 2-25 °C (temperatura ambiente ou refrigerado).
- Evitar exposição direta de luz solar.
- Não utilizar após a validade informada no rótulo.
- Não congelar.
- Não submeter a altas temperaturas

Precauções:

- Para evitar contaminação de DNA na reação, sempre utilizar luvas descartáveis durante a realização do teste.
- Abrir e remover os tubos de reação PCRRun das embalagens seladas de alumínio, somente imediatamente antes da sua utilização.
- Retornar os tubos de reação PCRRun não utilizados para a embalagem de alumínio original, juntamente com o dessecante. Selar com fita adesiva.**
- Não utilize o kit se a embalagem ou os componentes estiverem danificados.
- Cada componente neste kit é adequado para uso apenas com um número de lote específico. Os componentes foram homologados no controle da qualidade como unidade de lote padrão. Não misturar componentes de diferentes números de lote.
- Utilizar procedimentos sanitários do Brasil, destinados a resíduos biológicos e moleculares, no manuseio e descarte de componentes do kit.
- Realizar a extração de DNA em uma área separada da área utilizada para a reação PCRRun

INFORMAÇÕES

O Vírus da Leucemia Felina (FeLV) é um dos principais patógenos da fauna doméstica e gatos selvagens. É um retrovírus de fita simples que depende de um DNA intermediário para replicação. Se o sistema imunológico do gato não for capaz de neutralizar o vírus, o RNA viral é transformado e incorporado no genoma do gato. O DNA integrado é denominado "provírus".

Uma vez localizada no genoma, a divisão celular resultará em células filhas que contêm o DNA viral. O resultado é a persistência ao longo da vida do vírus. O FeLV é transferido principalmente pela exposição oronasal, saliva e secreções nasais, geralmente por meio de higiene mútua e tigelas comunitárias de comida e água. A transmissão vertical é considerada de importância secundária¹. O desenvolvimento da doença pode ser diferente para cada gato. Uma vez expostos, os felinos podem desenvolver uma infecção progressiva que leva a doenças associadas ao FeLV ou a uma infecção regressiva que se apresenta como uma infecção indetectável ou viremia transitória². Esses gatos latentemente infectados já demonstraram ter persistência do vírus no baço, medula óssea, linfonodos, intestino delgado e glândulas mamárias². O prognóstico de gatos infectados depende do sistema imune e idade, bem como da patogenicidade, pressão de infecção e concentração do vírus³.

DIAGNÓSTICO

Durante os estágios iniciais, o vírus se espalha para linfócitos e monócitos circulantes, distribuindo o vírus para os tecidos linfóides por todo o corpo. Um passo importante no processo da doença é a infecção da medula óssea, onde as células precursoras se tornam positivas para o vírus. Linfócitos, granulócitos e monócitos infectados são liberados no sangue, espalhando o vírus por todo o corpo, infectando órgãos e tecidos. O FeLV pode demonstrar vários sinais clínicos.

Os pacientes podem apresentar um ou mais dos seguintes sintomas; anemia, linfonodos aumentados, perda de peso, fraqueza progressiva, letargia e inflamação do nariz, córnea, gengivas e/ou boca⁴. Vários testes imunológicos e moleculares foram desenvolvidos para auxiliar no diagnóstico de infecções por FeLV. O isolamento do vírus continua sendo o padrão-ouro. O teste de imunofluorescência (FAT) de base sorológica e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) estão disponíveis, mas os gatos devem estar infectados por 6 e 4 semanas, respectivamente, para testarem positivo⁵. Os testes que detectam a presença do antígeno FeLV são mais aplicáveis em termos diagnósticos. Para definir a infecção progressiva, esses testes devem identificar a presença de antígenos associados às células. Métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR) que têm como alvo o DNA ou RNA viral do FeLV foram desenvolvidos para o diagnóstico na fração leucocitária do sangue total. Os testes baseados em RNA são adequados para uso durante os estágios virêmicos iniciais, enquanto os testes moleculares orientados para DNA são aplicáveis para determinar a exposição anterior e a doença latente. Com os testes moleculares, resultados positivos podem ser obtidos em menos de duas semanas após a exposição e, portanto, são considerados abordagens sensíveis e precisas para o diagnóstico⁶.

CONTEÚDO DO KIT

Conteúdo	Quantidade
4 tiras com reagentes liofilizados	1
Embalagem de alumínio com detector de ácido nucleico	4
Pipetas capilares de plástico - 20 µL*	5

* Pipetas calibradas e ponteiros com barreira para aerossol podem ser usada no lugar das pipetas de plástico.

EQUIPAMENTOS E SOLUÇÕES NECESSÁRIOS:

- Biogal PCRRun® Extrator de DNA da Amostra
- Bloco de aquecimento a 60 °C compatível com tubos de 0,2 mL para PCR.
- Bloco de aquecimento (comercializado pela Biogal)
- Temporizador
- Tesoura
- Caneta marcadora permanente de ponta fina
- Luvas descartáveis

COLETA, ESTOCAGEM E TRANSPORTE

O kit é utilizado para a detecção do ácido nucleico extraído de 50 µL de sangue total, utilizando reagentes para extração rápida de DNA. As amostras podem ser colhidas **de preferência com EDTA**. Anticoagulantes possuem uma substancial consequência em reações de PCR e por essa razão é necessário que o volume de sangue seja corretamente colhido de acordo com as instruções contidas no tubo. Para melhores resultados, use sempre amostras frescas e DNA recém-extraído. Se não for possível, as amostras e o DNA podem ser mantidos de 2 a 8°C por até 24 horas ou -20°C por um período maior.

PROTOCOLO - REAÇÃO PCRun®

1. Limpar a área de trabalho para o ensaio com solução de hipoclorito a 3,5%, diluído com água numa proporção de 1:10.

2. Material para o ensaio:

DNA extraído da amostra com o extrator de DNA N°30PRE104;
Embalagem com os tubos de reação;
Pipetas capilares para 20 µL de volume; Marcador de ponta fina;

3. Ligar o bloco de aquecimento e ajustar a 60°C. Assim que o bloco atingir a temperatura, prosseguir.

4. Retirar e destacar os tubos necessários para a reação PCRun® da embalagem. Quatro tubos individuais estão ligados por um espaçador de plástico fino. Utilizando uma tesoura pequena e limpa, destacar o número necessário de tubos sem abrir as tampas. Tomar cuidado para retornar os tubos não utilizados para a embalagem de alumínio e selar completamente com fita adesiva para manter um ambiente seco. Bata o tubo verticalmente e suavemente sobre uma superfície plana e firme para que todo o conteúdo desça ao fundo do tubo. A pequena pastilha branca deve estar localizada na parte inferior do tubo.

5. Identificar os tubos com o número de cada amostra.

6. Abrir cuidadosamente a tampa dos tubos de reação, um de cada vez. Com a pipeta capilar descartável de 20 µL, pipetar 20 µL do DNA extraído com o Kit de Extração de DNA PCRun® e transferi-lo para o tubo de reação. Confira se todo o conteúdo da pipeta capilar foi transferido corretamente ao tubo. Bata suavemente o tubo de reação em uma superfície rígida para trazer todo o fluido para o fundo do mesmo. Incube o tubo em temperatura ambiente por 1 minuto para permitir que o *pellet* se dissolva completamente.

7. Colocar o tubo de reação no orifício apropriado no bloco de aquecimento pré-aquecido (60 °C) e incubar durante exatamente 1 hora. Não abrir a tampa do tubo durante ou no final do período de incubação.

8. No final do período de incubação (1 hora), remover o tubo do bloco de aquecimento e imediatamente analisar com o dispositivo de detecção de ácido nucleico.

REAÇÃO COM O DISPOSITIVO DE DETECÇÃO de DNA 4 amostras.

É necessário um dispositivo de detecção de ácido nucleico descartável para cada amostra. Abrir e remover os componentes do dispositivo de detecção. O dispositivo é composto por duas peças de plástico, contendo no cartucho *amplicon* um bulbo com tampão e a câmara de detecção, contendo a tira de fluxo lateral (Fig. 1).

1. Verificar se o bulbo contém o tampão.

2. Identificar cada dispositivo com o número da amostra.

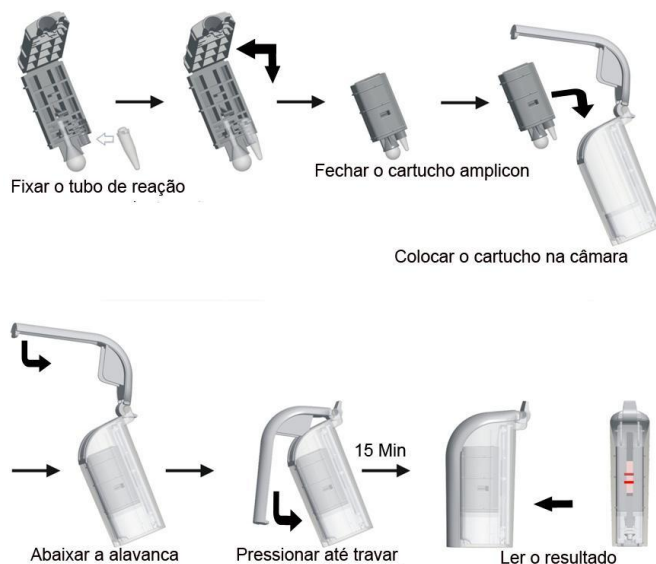
3. Fixar a seção da tampa do tubo de reação no espaço localizado ao lado do bulbo com tampão. Aplique uma leve pressão para prender o tubo de reação no cartucho *amplicon* (Fig. 1).

4. Feche bem o cartucho *amplicon*. Colocar o cartucho na câmara de detecção com o bulbo virado para baixo e para frente do dispositivo.

5. Empurrar a alavanca para baixo para travar o dispositivo.

6. Aguardar 15 minutos para ler os resultados. Resultados lidos após 30 minutos são inválidos.

Fig. 1



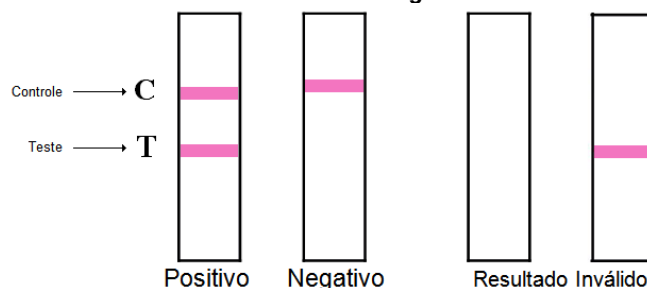
LEITURA E INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO

Para que o resultado seja válido, devem-se observar os seguintes requisitos (Fig. 2):

1. **Resultado Positivo** - Duas bandas aparecem, a linha de controle superior e a linha de ensaio inferior. O surgimento de ambas as linhas (a de controle e a linha do teste) indica a presença do FeLV.

2. **Resultado Negativo** - Uma única linha de controle aparece. A linha de controle deve aparecer independentemente de um resultado positivo ou negativo. O teste será inválido se a linha do controle não estiver presente. O aparecimento somente da linha controle indica apenas a ausência do DNA de FeLV ou que o número de cópias está abaixo do limite de detecção.

Fig. 2



LIMITAÇÕES

Como acontece com qualquer teste de diagnóstico, o resultado do PCRun® deve ser interpretado tendo em conta todos os dados clínicos e laboratoriais.

SENSIBILIDADE

Este teste pode detectar 10³ cópias do gene alvo no DNA purificado.

REFERÊNCIAS

1. Hoover, E. A., and J. I. Mullins. 1991. Feline leukemia virus infection and diseases. J. Am. Vet. Med. Assoc. 199:1287-1297.
2. Hayes, K.A., et al. 1989. Atypical localized viral expression in a cat with feline leukaemia. Vet. Rec. 124, 344-346.
3. Greene E.C. 2012. Infectious Diseases of the Dog and Cat, 4th edition. Elsevier Saunders. P.109.
4. Cattori, V., et al 2008. Real-time PCR investigation of feline leukemia virus proviral and viral RNA loads in leukocyte subsets. Vet. Immunol Immunopathol. 123(1-2), 124-128.
5. Lutz, H., et al. 1983. Monoclonal antibodies to three epitopic regions of feline leukemia virus p27 and their use in enzyme-linked immunosorbent assay of p27. J. Immunol. Methods 56:209-220.
6. Tandon, R., V. et al. 2005. Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan real-time polymerase chain reaction. J. Virol. Methods. 130:124-132.