Souprava VetMAX™ BVDV 4ALL

TaqMan® RT-PCR v reálném čase pro detekci viru způsobujícího BVD (typ 1, 2 a 3) a pestivirózu ovcí (BD, typ 1 až 6)

**Katalogové číslo** BVD4ALL

**Publikace č.** MAN0008959 **Rev**. B.0

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Technologie** | **Druhy** | **Nukleová kyselina izolovaná z matric** | **Typ testu** |
| Real-time RT-PCR (RNA)   * Duplexní test * Endogenní nebo exogenní (pouze pro sérum) IPC | Skot  Ovce  Kozy  Volně žijící přežvýkavci | Krev  Sérum  Biopsie z uší | Individuální nebo sdružený  (podle typu vzorku a použitého protokolu purifikace) |

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\uzivatel\AppData\Local\Temp\FineReader11.00\media\image1.jpeg | **VAROVÁNÍ!** Přečtěte si bezpečnostní listy (SDS) a dodržujte pokyny k manipulaci. Používejte vhodné ochranné brýle, oděv a rukavice. Bezpečnostní listy (BL) jsou k dispozici na adrese **thermofisher.com/support.** |
|  |  |
| C:\Users\uzivatel\AppData\Local\Temp\FineReader11.00\media\image2.jpeg | **VAROVÁNÍ! POTENCIÁLNÍ BIOLOGICKÉ NEBEZPEČÍ.** Přečtěte si bezpečnostní informace o biologickém nebezpečí na stránce daného výrobku na adrese **termofisher.com**. Používejte vhodné ochranné brýle, oděv a rukavice. |

**Informace o výrobku**

**Popis výrobku**

**Souprava Applied Biosystems™ VetMAX™ BVDV 4ALL** byla vyvinuta pro detekci sekvence z 5'UTR oblasti virového genomu (RNA) virů BVD (Bovine Viral Diarrhea) a BD (Border Disease). Souprava je vhodná pro všechny přežvýkavce: skot, malé přežvýkavce a volně žijící přežvýkavce.

Může být použita k detekci virové RNA extrahované ze **séra, plné krve odebrané do EDTA zkumavek** a ze vzorků **ušní biopsie**. V případě vzorků z ušní biopsie lze extrahovat virovou RNA pomocí **rychlé lyzační** metody [například souprava **VetMAX™ Ear Notch Fast Lysis Kit** (kat. č. FLK)]. Kompletní protokoly pro extrakci virové RNA z těchto matric jsou k dispozici na vyžádání od Technické podpory.

V závislosti na použitém protokolu izolace virové RNA a na typu vzorku lze soupravu **etMAX™ BVDV 4ALL** použít na jednotlivé nebo sdružené vzorky (podle národních, regionálních nebo místních předpisů).

Každý vzorek RNA získaný po extrakci nebo rychlé lýze je analyzován v jedné jamce: stejná jamka je použita ke specifické detekci virové RNA virů BVD a BD a k detekci IPC (interní pozitivní kontroly). Pozitivní IPC znamená jak úspěšnou extrakci, tak i nepřítomnost inhibitorů PCR ve vzorku. Cílová struktura IPC je endogenní pro buněčné vzorky (krev a materiál z ucha). Vzorky séra vyžadují přidání exogenního IPC (dodaného se soupravou) před extrakcí virové RNA.

**Obsah soupravy a skladování**

Po převzetí musí být celá souprava uložena při teplotě **-30 °C až -10 °C**. Při prvním použití soupravy postupujte podle doporučení pro skladování, která jsou uvedena pro každou jednotlivou složku v následující tabulce:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Složka** | **Popis** | **Objem**  **(100 25 μl reakcí)** | **Skladování** | |
| **Po obdržení** | **Po prvním použití** |
| 3 - Mix BVDV 4ALL  (Zelená zkumavka) | Mix pro TaqMan® RT-PCR. Obsahuje:   * Detekční systém pro cílové struktury BVDV: přední (forward) primer a reverzní primer, a dále sondu TaqMan® označenou symbolem **FAM**™ - **NFQ** (NFQ = nefluorescenční zhášeč). * Detekční systém pro IPC: přední (forward) a reverzní primery a sondu TaqMan® označenou symbolem **VIC**™ - **TAMRA**™. * Pufr, reverzní transkriptázu a PCR enzym. | 4 x 500 μl | -30°C až -10°C | -30°C až -10°C |
| 4c - EPC BVDV 4ALL  (Modrá zkumavka) | **Externí pozitivní kontrola:**  BVDV pozitivní kontrola. Jedná se o neaktivní biologickou reagencii, která má **být extrahována nebo lyzována** a poté amplifikována během RT-PCR v reálném čase. | 150 μl | -30°C až -10°C | -30°C až -10°C |
| 5 - IPC BVDV 4ALL(1)  (Žlutá zkumavka) | Interní pozitivní kontrola (pouze pro sérum):  Exogenní interní kontrola, **která se přidává do lyzačního roztoku použitého k extrakci RNA ze vzorků séra a k pozitivním a negativním extrakčním kontrolám**. Může se také použit pouze jako amplifikační kontrola, pokud je přidána k extrahované RNA. | 500 μl | -30°C až -10°C | -30°C až -10°C |

(1) Pro malé extrakční řady se doporučuje připravit alikvoty 5-IPC BVDV 4ALL v minimálním objemu 50 μl, aby se zamezilo více než 3 cyklům zmrazení/rozmrazení.

**Extrakční a amplifikační kontroly**

**Souprava VetMAX ™ BVDV 4ALL** obsahuje 2 kontroly, které umožňují validovat extrakci a amplifikaci virové RNA.

**4c - EPC BVDV 4ALL: BVDV positive control (pozitivní kontrola)**

Extrahujte nebo lyzujte 4c - EPC BVDV 4ALL současně se vzorky, jak je popsáno v následující tabulce.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Extrakční nebo lyzační metoda** | **Použijte tento objem 4c - EPC BVDV 4ALL** | **Použijte tento eluční objem** |
| Silika kolony nebo magnetické kuličky | 50 μl | 50-80 μl |
| Rychlá lýza | 50 μl | - |

RNA extrahovanou z 4c - EPC BVDV 4ALL uchovávejte při teplotě nižší než -16 °C. V případě potřeby skladujte v menších alikvotech, aby se zamezilo více než 3 cyklům zmrazení-rozmrazení.

Pozitivní výsledek v rámci specifikovaného rozsahu Ct se používá k validaci extrakce a amplifikace cílové struktury BVDV pomocí RT-PCR v reálném čase.

**5 - IPC BVDV 4ALL: exogenous Internal Positive Control (for serum only) (exogenní interní pozitivní kontrola) (pouze pro sérum)**

Vzorky séra vyžadují exogenní zdroj IPC; tato složka se přidává do lyzačního roztoku používaného k extrakci RNA ze vzorků séra, a dále k přípravě pozitivního kontrolního vzorku BVDV a negativního extrakčního kontrolního vzorku (NCS). Cílová struktura IPC je již přítomna v buněčných vzorcích (vzorky krve a ušní biopsie), to znamená, že k těmto vzorkům již není nutné přidávat 5-IPC BVDV 4ALL.

Pro extrakční řady, které zahrnují pouze vzorky séra, přidejte 5 μl 5-IPC BVDV 4ALL do lyzačního pufru během extrakce RNA ze vzorků, pozitivní kontroly BVDV a NCS. Alternativně při použití pouze jako kontrola amplifikace přidejte 5 μl 5-IPC BVDV 4ALL do 50 μl extrahované RNA.

Pro extrakční řady, které neobsahují vzorky séra, připravte lyzační roztok bez 5-IPC BVDV 4ALL pro buněčné vzorky, pozitivní kontrolu BVDV a NCS.

Pro extrakční řady, které obsahují vzorky séra i buněčné vzorky:

* Přidejte 5 μL 5-IPC BVDV 4ALL do lyzačního pufru pro vzorky séra, pozitivní kontroly BVDV a NCS.
* Připravte lyzační roztok bez 5-IPC BVDV 4ALL pro buněčné vzorky v extrakčních řadách.

Kritéria pro validaci vzorků nebo kontrol naleznete v hodnotách Ct pro cílové struktury IPC v částech „Validace“ a „Interpretace výsledků“.

**Pro konfirmaci správné analýzy doporučujeme zahrnout dvě negativní kontroly:**

**NCS: negative extraction control (NCS: negativní extrakční kontrola)**

Tato kontrola sestává z reagencií použitých při extrakci bez přidání vzorku (objem vzorku může být nahrazen pufrem použitým při přípravě vzorku nebo vodou bez DNázy/RNázy), které procházejí stejným zpracováním jako vzorky.

Tato kontrola umožňuje validovat nepřítomnost kontaminace během extrakce a reakcí RT-PCR v reálném čase. Kritéria pro validaci nepřítomnosti kontaminace viz hodnoty Ct pro NCS v části „Validace“.

**NC: negative amplification control (negativní amplifikační kontrola)**

Jedná se o amplifikační mix deponovaný na destičce během přípravy RT-PCR v reálném čase, s přidáním 5 μl vody bez DNázy/RNázy k úpravě reakce na 25 μl nebo 15 μl v závislosti na typu aplikace (závisí na metodě extrakce virové RNA). U všech matric vzorku tato kontrola potvrzuje nepřítomnost kontaminace během přípravy RT-PCR reakce v reálném čase, pokud je negativní pro všechny cíle (BVDV a IPC).

**Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky**

Pokud není uvedeno jinak, jsou všechny materiály k dispozici na stránce **thermofisher.com**.

* **Nastavitelné mikropipety** (rozmezí od 1 μl do 1000 μl) s **filtrovanými** špičkamibez DNázy/RNázy.
* Voda bez DNázy/RNázy
* 1X TE pufr
* 1X PBS pufr
* **Termocykler pro PCR c reálném čase** schopný detekovat následující fluorofory: **FAM**™ (emisní maximum: λ515 nm); **VIC**™ (emisní maximum: λ554 nm); a ROX™ pasivní reference
* Spotřební materiál potřebné optické kvality kompatibilní s termocyklerem:
  + 96-jamkové PCR destičky, PCR stripy (8 nebo 12 jamek), mikrozkumavky nebo kapiláry
  + Filmy nebo kompatibilní uzávěry

**Postup analýzy**

Reakční objem RT-PCR v reálném čase je 25 μl nebo 15 μl v závislosti na typu aplikace (závisí na použité metodě extrakce virové RNA):

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Rekonstituce reakčního mixu** | **Standardní aplikace**  **(RNA extrahovaná na kolonách nebo magnetickými kuličkami)** | **Rychlá aplikace lýzy pro vzorky biopsie ucha**  **(RNA extrahovaná rychlou lýzou)** |
| 3 - Mix BVDV 4ALL | 20 μl | 10 μl |
| RNA extrahovaná ze vzorků | 5 μl | 5 μl |
| Celkový reakční objem | 25 μl | 15 μl |

**Extrakce virové RNA**

RNA musí být izolována ze vzorků pro analýzu RT-PCR v reálném čase.

Před prvním použitím této soupravy připravte pozitivní kontrolní vzorek BVDV extrakcí 4c - EPC BVD4 ALL za použití stejné metody jako u testovaných vzorků. BVDV pozitivní kontrolní vzorek může být použit v následujících RT-PCR analýzách s testovanými vzorky, které byly extrahovány stejným způsobem.

U vzorků séra přidejte 5 μl 5-IPC BVDV 4ALL do lyzačního roztoku použitého pro extrakci RNA ze vzorků, do BVDV pozitivní kontroly a NCS.

**POZNÁMKA**: V případě zájmu o informace o metodách extrakce, které jsou kompatibilní a validované se soupravou **VetMAX™ BVDV 4ALL**, jakož i informace o soupravě **VetMAX ™ Ear Notch Fast Lysis Kit** (Kat. č. FLK) kontaktujte technickou podporu.

**Příprava RT-PCR v reálném čase**

1. Vytvořte plán analýzy pro distribuci mixů a vzorků. Je-li to možné, uchovávejte pozitivní kontrolu BVDV odděleně od ostatních vzorků.
2. Rozmrazte **3 - Mix BVDV 4ALL** při teplotě 2 °C až + 8 °C na ledě nebo v chlazeném stojanu.
3. Rozmíchejte opatrně **3 - Mix BVDV 4ALL** a poté krátce centrifugujte.
4. V závislosti na typu aplikace přidejte **20 μl nebo 10 μl 3 - mixu BVDV 4ALL** do každé jamky PCR destičky, do každého PCR stripu nebo do každé kapiláry.
5. Přidejte RNA ze vzorků a kontrol do roztoku mixu pro RT-PCR v reálném čase podle následujícího předem nastaveného plánu analýzy:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Typ analýzy** | **Složka** | **Objem vzorku** |
| Vzorek pro analýzu | RNA extrahovaná ze vzorku | 5 μl |
| BVDV positive control (pozitivní kontrola) | RNA extracted from **4c - EPC BVDV 4ALL (**RNA extrahovaná z **4c - EPC BVDV 4ALL)** | 5 μl |
| Negative extraction control (Negativní extrakční kontrola) (NCS) | Negative extraction control sample (Negativní extrakční kontrolní vzorek) | 5 μl |
| Negative amplification control (Negativní amplifikační kontrola) (NC) | DNase/RNase-free water (Voda bez DNázy/RNázy) | 5 μl |

1. Zakryjte PCR destičku, PCR stripy nebo kapiláry adhezivním víčkem destičky nebo vhodnými uzávěry.

**Amplifikace RT-PCR v reálném čas**

1. Nastavte cyklus RT-PCR v reálném čase podle pokynů výrobce za použití následujících parametrů.

* Reakční objem: 15 μl (rychlá aplikace lýzy) nebo 25 μl (standardní aplikace)
* ROX ™ pasivní referenční barvivo: součástí balení 3 - Mix BVDV 4ALL

1. Nastavte a přiřaďte barviva reportéru a zhášeče sondy TaqMan® pro každou jamku použitou v analýze:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Cílová struktura** | **Reportér** | **Quencher** |
| BVDV | Barvivo FAM™ | NFQ (nefluorescenční zhášeč) |
| IPC | Barvivo VIC™ | Barvivo TAMRA™(1) |
| Pasivní reference: Barvivo ROX™(2) | | |

(1)Fluorofor TAMRA™ musí být nastaven pro analýzu RT-PCR v reálném čase, pokud je termocykler schopen jej detekovat. Neschopnost jiných termocyklerů detekovat tento fluorofor nemá vliv na správnost měření.

(2) Pasivní reference ROX™ musí být nastavena v případě, že se termocykler nenastaví automaticky.

1. Vytvořte následující program RT-PCR v reálném čase pro analýzu:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Program 1** | **Opakování kroků** | **Teplota** | **Doba trvání** |
| Krok 1 | 1x | 45 °C | 10 minut |
| Krok 2 | 1x | 95 °C | 10 minut |
| Krok 3 | 45x | 95 °C | 15 sekund |
| 60 °C(1) | 1 minuta |

(1) Zaznamenejte fluorescenční data během jednominutové fáze o teplotě 60 °C.

1. Vložte PCR destičku, PCR stripy nebo kapiláry do termocykleru a spusťte RT-PCR v reálném čase.

**Analýza výsledků**

**Analýza surových dat**

Pro analýzu surových dat postupujte podle doporučení výrobce termocykléru.

1. Prahové limity nastavte odděleně pro každý cíl RT-PCR v reálném čase.
2. Pro každý detektor interpretujte výsledky podle hodnot Ct vzorku získaných podle doporučení níže.

**Validace**

Pro validaci cyklu RT-PCR v reálném čase viz hodnoty Ct QC uvedené v certifikátu analýzy šarže použité v daném testu. Cyklus je validován, pokud jsou splněna následující kritéria:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Kontrolní reakce** | **Cílová struktura BVDV** | **Cílová struktura IPC (barvivo VIC™)** | | **Validace** |
| **(Barvivo FAM™)** | **Bez použití 5 - IPC BVDV 4ALL(1)** | **S použitím 5 - IPC BVDV 4ALL(2)** |
| BVDV positive control (pozitivní kontrola) | Ct = Ct QC BVDV  **4c - EPC BVDV 4ALL** ±3Ct(3) | Ct < 45 nebo Ct > 45(4) | Ct = Ct QC IPC  **5 - IPC BVDV 4ALL** ±3 Ct(5) | RT-PCR validována |
| NCS | Ct > 45 | Ct > 45 | Ct = Ct QC IPC  **5 - IPC BVDV 4ALL** ±3Ct(5) | Validováno pro extrakci |
| NC | Ct > 45 | Ct > 45 | Ct > 45 | Validováno pro PCR reagencie |

(1) Pro extrakční řady, které neobsahují vzorky séra.

(2) Pro extrakční řady, které obsahují pouze vzorky séra nebo směs séra a buněčných vzorků.

(3) Viz hodnoty uvedené pro metodu extrakce použitou v části 2.1 „EPC“ certifikátu analýzy.

(4) Hodnota IPC pozitivní kontroly BVDV se nepoužije k validaci testu v případě buněčných vzorků.

(5) Viz hodnoty uvedené v části 2.2 „IPC“ certifikátu analýzy. Interpretace výsledků

**Interpretace výsledků**

Pro každý analyzovaný vzorek interpretujte výsledky podle následujících tabulek.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Cílová struktura BVDV**  **(Barvivo FAM™)** | **Cíl IPC**  **(Barvivo VIC™)** | **Interpretace** |
| Ct < 45 | Ct < 45 nebo Ct > 45 | BVDV detekován |
| Ct > 45 | Ct < 45 | BVDV nebyl detekován |
| Ct > 45 | Ct > 45 | Neplatné výsledky(1) |

(1) Výsledek je neplatný z důvodu nevyhovujícího výsledku IPC.

**Jak zacházet se vzorky s neplatnými výsledky**

1. Nařeďte RNA v poměru 1:10 v 1X TE pufru.
2. Proveďte RT-PCR analýzu na 5 μl naředěného vzorku.
3. Pokud je zředěná RNA pozitivní nebo negativní na BVDV s vyhovujícím výsledkem IPC, získaný výsledek je platný.
4. Pokud je zředěná RNA negativní na BVDV a současně je nevyhovující výsledek IPC, je získaný výsledek neplatný. V tomto případě postupujte následovně:
5. U každého vzorku z biopsie ucha opakujte extrakci RNA a RT-PCR buď na novém vzorku z ucha, nebo na jiné matrici vzorku ze stejného zvířete, pokud tak povolují národní, regionální nebo místní předpisy.
6. U ostatních matric vzorku opakujte extrakci RNA za použití stejného vzorku zředěného 1:10 v 1X PBS pufru a proveďte RT-PCR. Pokud je výsledek stále neplatný, opakujte extrakci RNA a RT-PCR na novém vzorku.

**Dokumentace a podpora**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Zákaznická a technická podpora**  Technická podpora: návštěva **thermofisher.com/askaquestion** Navštivte **thermofisher.com/support** pro nejnovější služby a podporu, včetně:   * Mezinárodní kontaktní telefonní čísla * Objednávková a webová podpora * Uživatelské příručky, manuály a protokoly * Osvědčení o analýze * Bezpečnostní listy (BL; označované též zkratkou MSDS) POZNÁMKA: Pokud chcete získat bezpečnostní listy pro chemické látky jiných výrobců, kontaktujte výrobce. |  |  |
|  |  |