virotype BVDV RT-PCR Kit

Příručka

# Pro detekci RNA viru u bovinní virové diarrhoey

 24 reakcí (kat. č. VT280373)

  96 reakcí (kat. č. VT280375)

  480 reakcí (kat. č. VT280377)

INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Deutscher Platz 5b, 04103 Leipzig, Germany



# Obsah

[Obsah soupravy 3](#_TOC_250017)

[Účel použití 3](#_TOC_250016)

[Symboly 4](#_TOC_250015)

[Kontrola kvality 4](#_TOC_250014)

[Skladování 5](#_TOC_250013)

[Bezpečnostní informace 5](#_TOC_250012)

[Úvod 6](#_TOC_250011)

[Princip 6](#_TOC_250010)

[RNA extrakce 7](#_TOC_250009)

[Vybavení a reagencie zajištěné uživatelem 8](#_TOC_250008)

[Důležitá upozornění 9](#_TOC_250007)

[Obecná opatření 9](#_TOC_250006)

Protokol: Real-time RT-PCR pro detekci RNA viru u bovinní virové diarrhoey...……………………………………………………………….11

[Důležité body před spuštěním 11](#_TOC_250005)

[Co je třeba udělat před zahájením testu 11](#_TOC_250004)

[Postup 12](#_TOC_250003)

[Analýza a intepretace dat 15](#_TOC_250002)

[Interpretace výsledků 15](#_TOC_250001)

[Index změn 19](#_TOC_250000)

# Obsah soupravy

virotype BVDV RT-PCR Kit Kat. č.

Počet reakcí

(24) VT280373 24

PCR Mix (zkumavka se žlutým víčkem) zahrnující primery, próby a interní kontrolu

1x 500 µl

2 x 1000 µl 6 x 1650 µl

(96) VT280375 96

(480) VT280377 480

Enzymový mix

(zkumavka se zeleným víčkem)

 1 x 6.5 µl 1 x 26 µl 2 x 65 µl

Pozitivní kontrola

(zkumavka s červeným víčkem)

1 x 25 µl

1 x 150 µl

2 x 150 µl

Negativní kontrola

(zkumavka s modrým víčkem) 1 x 25 µl 1 x 150 µl 1 x 300 µl

Příručka 1 1 1

# Účel použití

Souprava virotype BVDV RT-PCR Kit je určena k detekci RNA viru bovinní virové diarrhoey v krvi, plazmě, séru, mléce a ušních tkáních (jednotlivě nebo společně) u skotu.

Souprava je schválena institutem Friedrich-Loeffler-Institut a je licencována podle § 11 odst. 2 německého zákona o zdraví zvířat (FLI-B 451) pro použití v Německu pro veterinární diagnostické postupy.

Pouze pro veterinární použití.

# Symboly

Zákonný výrobce

  Číslo šarže

 Spotřebujte do

 Teplotní omezení při skladování

 Příručka

 Katalogové číslo  Číslo materiálu

 Chraňte před světlem

 Pro vzorky skotu

# Kontrola kvality

V souladu se systémem řízení jakosti ISO certifikovaným společností ISO je každá šarže virotype BVDV RT-PCR Kit testována na základě předem stanovených specifikací, aby byla zajištěna konzistentní kvalita produktu.

# Skladování

Komponenty soupravy virotype BVDV RT-PCR Kit by měly být uchovávány při teplotě -30 °C až -15 °C a jsou stabilní do data exspirace uvedeného na štítku. Vyhněte se opakovanému rozmrazování a zmrazení (> 2x), protože to může snížit citlivost testu. Zmrazte součásti v alikvotech, pokud budou používány pouze přerušovaně.

# Bezpečnostní informace

Při práci s chemikáliemi vždy noste vhodný laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace naleznete v příslušných bezpečnostních listech (SDS). Tyto informace získáte od místního obchodního zástupce nebo e-mailem na adrese compliance@indical.com.

Všechny zbytky vzorků a předměty, které přišli do styku se vzorky, musí být dekontaminovány nebo zneškodněny jako potenciálně infekční materiál.

# Úvod

Bovinní virová diarrhoea (BVD) a slizniční onemocnění (MD) jsou způsobeny virem bovinní virové diarrhoey (BVDV I, II), jednovláknovým RNA virem. Bovinní diarrhoea virus (BVDV I, II) patří do skupiny pestivirů stejně jako CSFV.

BVD je ekonomicky závažná infekční choroba skotu. V závislosti na imunitním stavu zvířat mohou infekce BVDV vést ke gastrointestinálním a respiračním příznakům s různou závažností a reprodukčními problémy. Ty jsou způsobeny transplacentární infekcí plodu, která vede k potratům, kongenitálním malformacím a v případě infekce před imunokompetencí k trvale infikovaným (PI nebo viraemickým) telatům. PI zvířata se objevují pouze v prenatální infekci, zatímco postnatální infekce vedou k přechodné virémii, což vyvolává tvorbu neutralizačních protilátek.

Neidentifikovaná zvířata PI jsou zodpovědná za šíření BVDV, protože během celého svého života vylučují vysoké dávky viru. Tak mohou infikovat těhotné živočichy, kteří zase mohou porodit nové PI zvířata. Hlavní cestou k úspěšnému boji s onemocněním je včasná identifikace těchto zvířat.

# Princip

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je založena na amplifikaci specifických oblastí patogenního genomu. V RT-PCR v reálném čase je amplifikovaný produkt detekován pomocí fluorescenčních barviv. Ty jsou obvykle spojeny s oligonukleotidovými próbami, které se specificky váží na amplifikovaný produkt. Sledování intenzity fluorescence během testu PCR (tj. v reálném čase) umožňuje detekci akumulačního produktu bez nutnosti opětovného otevření reakčních zkumavek.

Virotype BVDV RT-PCR kit obsahuje všechny potřebné reagencie pro detekci BVDV RNA včetně pozitivní a negativní kontroly. S touto soupravou se provádí reverzní transkripce a PCR v jedné reakční zkumavce, což snižuje riziko kontaminace.

Souprava používá dvě specifické kombinace primer/próba: jedna pro pestiviry, které poskytují fluorescenci FAM a druhá pro vnitřní kontrolu, za vzniku fluorescence HEX. Tato vnitřní kontrola vylučuje možnost falešně negativních výsledků.

# RNA extrakce

Virotype BVDV RT-PCR Kit je velmi citlivé řešení pro detekci RNA viru bovinní virové diarrhoey v krvi, plazmě, séru, mléce a ušních tkáních skotu.

Přednostně použijte plazma EDTA, protože virové RNA je minimálně degradována v přítomnosti EDTA. Vzhledem k vysoké citlivosti testu mohou být analyzovány skupiny obsahující 50 jednotlivých vzorků krve (krev, plazma, sérum), 100 vzorků individuálních vzorků mléka a shromážděných vzorků ušních tkání složených z 25 jednotlivých vzorků. Optimální velikost skupiny však závisí na regionální prevalenci BVDV a věku zvířat.

Před RT-PCR v reálném čase musí být z výchozí látky extrahována virová RNA. INDICAL nabízí řadu validovaných souprav pro extrakci RNA a DNA ze vzorků zvířat.

* QIAamp cador Pathogen Mini Kit
* cador Pathogen 96 QIAcube HT Kit
* MagAttract 96 cador Pathogen Kit

Kromě toho lze extrakční kity zakoupit také od společnosti QIAGEN GmbH

* QIAamp Viral RNA Mini Kit
* RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit

Pokud se neprovádí RT-PCR v reálném čase bezprostředně po extrakci, uchovávejte RNA při -20 ° C nebo při -70 ° C pro delší skladování.

Pro rychlou přípravu vzorků ušních tkání (o průměru 2-3 mm) bez izolace RNA se doporučuje použití virotypového tkáňového lýzového činidla. Tkáňové lyzáty se uchovávají při teplotě -20 ° C nebo 2-8 ° C po dobu až 12 hodin.

Extrakce RNA s použitím kitu založeného na technologii spin-column může být automatizována pomocí QIAcube.

# Vybavení a reagencie zajištěné uživatelem

Při práci s chemikáliemi vždy noste vhodný laboratorní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace naleznete v příslušných bezpečnostních listech (SDS) dostupných u dodavatele produktu.

* Pipety
* Špičky pipet odolné vůči aerosolům, které neobsahují nukleázu, s filtrem
* Sterilní 1,5 ml Eppendorf zkumavky
* Spotřební materiál neobsahující nukleázu (bez RNázy/DNázy).
Zvláštní pozornost by měla být věnována tomu, aby se zabránilo kontaminaci všech reagencií a spotřebního materiálu použitých pro stanovení PCR pro citlivou identifikaci virových nukleových kyselin
* Chladící zařízení nebo led
* Stolní centrifuga s rotorem pro 1,5 ml zkumavky
* Real-time cykler s vhodnými fluorescenčními kanály
* Odpovídající software pro vybraný real-time cykler
* Vhodné zkumavky a víčka nebo 96jamková mikrotitrační destička s optickou těsnící fólií nebo krytem pro vybraný real-time cykler

# Důležitá upozornění

## Obecná opatření

### Uživatel by měl vždy věnovat pozornost následujícím skutečnostem:

* Používejte špičky s filtrem neobsahující nukleázu.
* Uskladněte a extrahujte pozitivní materiály (vzorky, pozitivní kontroly a amplicony) odděleně od všech ostatních reagencií a přidávejte je do reakční směsi v prostorově odděleném zařízení.
* Před zahájením testu rozmrazte všechny složky na ledu.
* Po rozmrazení smíchejte komponenty krátkým otočením a odstředěním.
* Nepoužívejte součásti testovací soupravy po uplynutí doby expirace.
* Uchovávejte vzorky a kontroly na ledu nebo v chladicím bloku během nastavování reakcí.

### Negativní kontrola

V každém testu PCR by měla být zahrnuta alespoň jedna negativní kontrolní reakce. To umožňuje posoudit kontaminaci reakce. Všimněte si, že interní kontrola RNA bude detekována v negativní kontrole, protože je obsažena v reakční směsi jako amplifikační kontrola (viz níže "Interní kontrola").

### Pozitivní kontrola

Při provádění testu PCR na neznámých vzorcích se doporučuje provést pozitivní kontrolní reakci v testu PCR, který obsahuje vzorek, o kterém je známo, že cíleně obsahuje virovou RNA. Pozitivní kontrola slouží k prokázání funkčnosti testu patogenů, např. správného nastavení reakční směsi. Pro úspěšnou amplifikaci použijte 5 μl pozitivní kontroly dodané s virotype BVDV RT-PCR Kit.

### Interní kontrola

Pro usnadnění je interní kontrola RNA již obsažena v poskytnutých reagenciích. To eliminuje potřebu přidávat interní kontrolu k jednotlivým vzorkům samostatně během nastavení reakce. Interní kontrola umožňuje uživateli monitorovat inhibici PCR.

# Protokol: Real-time RT-PCR pro detekci RNA viru u bovinní virové diarrhoey

## Důležité body před spuštěním

* Prosím přečtěte si „Důležitá upozornění“ na straně 9 před spuštěním.
* Zahrňte alespoň jednu pozitivní kontrolu (pozitivní kontrola) a jednu negativní kontrolu (negativní kontrola) na jeden test PCR.
* Před zahájením procedury si přečtěte protokol a ujistěte se, že jste obeznámeni s provozem vybraného real-time PCR cykleru
* RNA je nestabilní. Proveďte testovací proceduru bez přerušování.

## Co je třeba udělat před zahájením testu

* Rozmrazte všechny reagencie na ledě a chraňte před světlem
* Udržujte reagencie na ledu během nastavování PCR reakce
* Enzymový mix vyjměte z místa skladování o -20 °C bezprostředně před použitím. Udržujte ho na ledu a ihned po použití jej vraťte na místo skladování o -20 °C.
* Reagencie před použitím krátce zamíchejte otočením.

## Postup

1. Připravte Master Mix podle Tabulky 1.

Master Mix obsahuje všechny komponenty potřebné pro PCR s výjimkou vzorku. Připravte objem Master Mix nejméně o 10% větší, než je požadováno pro celkový počet PCR testů, které mají být provedeny.

Tabulka 1 uvádí objemy na počet reakcí pro Master Mix.

Tabulka 1. Příprava Master Mixu

 Počet reakcí Komponenty 1 24 96 480

PCR Mix

(žluté víčko)

19.75 µl 493.75 µl

1896 µl

9480 µl

 Enzymový Mix (zelené víčko)

0,25 µl 6,25 µl 24 µl 120 µl

Celkový objem

20 µl

500 µl

1920 µl

9600 µl

1. Do každé reakční zkumavky pipetujte 20 μl Master Mixu. Pak přidejte 5 μl vzorku RNA (Tabulka 2).

Zahrňte pozitivní a negativní kontrolní reakce

Pozitivní kontrola: Použijte 5 μl pozitivní kontroly (Positive Control) místo vzorku RNA.

Negativní kontrola: Použijte 5 µl negativní kontroly (Negative Control) místo vzorku RNA.

Tabulka 2. Příprava reakčního mixu

Komponenty Objem

Master Mix 20 µl

Vzorek 5 µl

Celkový objem 25 µl

1. Uzavřete reakční zkumavky příslušnými víčky.
2. Nastavte filtry pro uvedené barvy v softwaru termocykleru podle Tabulky 3.

Tabulka 3. Nastavení filtrů pro barvy a kanály

Patogen/ interní kontrola

Kanál Rotor-Gene Q

BVDV FAM zelený

Interní kontrola HEX/ JOE1 žlutý

Pasivní reference2 ROX -

1. Použijte alternativu vhodnou pro Váš termocykler.
2. Interní reference pro použití na Applied Biosystems 7500
3. Spusťte real-time RT-PCR protokol podle Tabulky 4.

Tabulka 4. Real-time RT-PCR protokol pro BVDV

Krok Teplota Čas

 Počet cyklů

Reverzní transkripce 50 °C 20 min 1

3-krokový cyklus

95 °C

Iniciační aktivace

15 min

1

Denaturace 95 °C 30 s

Annealing\* 57 °C 45 s 40

Extenze 68 °C 45 s

\* Sběr fluorescenčních dat. Přibližná doba běhu 2h 38min (Rotor-Gene Q)

# Analýza a interpretace dat

### Interpretace výsledků

Aby byl test platný, pozitivní kontrola musí vykázat signál v obou kanálech FAM a HEX s hodnotou CT1 < 36. Negativní kontrola nesmí vykázat signál v kanálu FAM.

Následující výsledky jsou možné, pokud pracujete s neznámými vzorky. Možné výsledky vzorků jsou rovněž shrnuty v tabulce 5 na straně 17.

Vzorek je pozitivní na BVDV a test je platný, pokud jsou splněna následující kritéria:

* Vzorek vykazuje signál v obou kanálech FAM a HEX.
* Negativní kontrola vykazuje signál v kanálu HEX s hodnotou CT < 36
* Negativní kontrola nevykazuje signál v kanálu FAM.

Všimněte si, že velmi vysoké koncentrace BVDV RNA ve vzorku mohou vést ke sníženému signálu v kanálu HEX nebo k žádnému signálu v kanálu HEX kvůli konkurenci s interní kontrolou. Pokud je hodnota CT fluorescence FAM menší než 30, je vzorek s největší pravděpodobností od trvale infikovaného zvířete (zvíře PI).

1 Threshold cyklus (CT) — cyklus, ve kterém amplifikační diagram překročí prahovou hodnotu, tj. je zde první zřetelně zjistitelný nárůst fluorescence.

Vzorek je negativní na BVDV a test je platný, pokud jsou splněna následující kritéria:

* Vzorek vykazuje signál v HEX kanálu, ale ne v kanálu FAM.
* Pozitivní kontrola vykazuje signál v obou kanálech FAM a HEX.
* Negativní kontrola vykazuje signál v kanálu HEX.
* Negativní kontrola nevykazuje signál v kanálu FAM.

Pozitivní signál v kanálu HEX znamená, že PCR reakce byla úspěšná, když byla amplifikována interní kontrola.

Výsledky vzorků jsou neprůkazné a test je neplatný, pokud jsou splněna tato kritéria:

* Vzorek nevykazuje signál v kanálech FAM a HEX.

Není-li detekován žádný signál v kanálech FAM (patogen) a HEX (interní kontrola), výsledek je neprůkazný. Absence signálu pro interní kontrolu naznačuje inhibici PCR a / nebo jiné poruchy.

Pro kontrolu inhibice doporučujeme ředění vzorku RNA ve vodě (bez nukleáz) 1:5.

Zkontrolujte, zda je v kanálu FAM fluorescenční signál pro pozitivní kontrolní reakci (pozitivní kontrola). Chybějící signál pro pozitivní kontrolu indikuje chybu, která může být způsobena nesprávným nastavením Master Mixu nebo nesprávnými podmínkami cyklu.

Tabulka 5. Tabulka interpretace výsledků\*

Výsledek vzorku

FAM (BVDV)

HEX (IC)

BVDV pozitivní X X

BVDV pozitivní

(silně pozitivní)

X

BVDV negativní X

neprůkazný

\*Interpretace výsledků vzorků může být stanovena za předpokladu, že jsou prováděny pozitivní a negativní kontrolní reakce. Pozitivní kontrola musí poskytovat signál v obou kanálech FAM a HEX. Negativní kontrola musí poskytnout signál v HEX kanálu. Podrobné vysvětlení možných výsledků získáte v části "Analýza a interpretace dat" na straně 15.

INDICAL nabízí řadu souprav ELISA a souprav real-time PCR a real-time RT-PCR souprav pro detekci živočišných patogenů.

Navštivte www.indical.com, kde naleznete další informace o produktech baktotyp, cador, cattletype, flocktype, pigtype a virotype.

Aktualizované informace o licencích a odmítnutí odpovědnosti za konkrétní produkt naleznete v příslušné příručce k soupravě INDICAL nebo uživatelské příručce.

### Index změn

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Příručka | Verze | Změna |
| HB-1577-EN-006 | Říjen 2018 | Změna v „Interpretace výsledků“ |
| HB-1577-EN-005 | Květen 2018 | INDICAL design |

Objednávky: [www.indical.com/contact](http://www.indical.com/contact) Technická podpora: support@indical.com

Web: [www.indical.com](http://www.indical.com/)