VetMAX™ BTV NS3 All Genotypes Kit

RT‑PCR v reálném čase se sondou TaqMan™ pro detekci BTV (viru bluetongue)

Katalogové číslo BTVNS3

Pub. č. MAN0026136  Rev. B.0

DŮLEŽITÉ! Výrobek je registrován u francouzské národní referenční laboratoři Anses Maisons-Alfort. Pro použití soupravy při diagnostických postupech ve Francii platí zvláštní požadavky, viz příloha A.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Technologie | Druhy | Nukleová kyselina izolovaná z matric | Typ testu |
| RT‑PCR v reálném čase (RNA) – Duplexní – Endogenní IPC (Internal Positive Control) | Skot  Malí přežvýkavci (ovce, kozy) | Krev (v EDTA zkumavkách)  Slezina nebo potracený plod (slezina, játra, srdce) | Individuální |

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |

|  |  |
| --- | --- |
| generic.png | VAROVÁNÍ! Přečtěte si bezpečnostní listy (BL) a postupujte podle pokynů pro zacházení. Noste vhodné ochranné brýle, oděv a rukavice. Bezpečnostní listy (BL) jsou k dispozici na adrese [thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support). |
|  |  |
| generic.png | VAROVÁNÍ! POTENCIÁLNÍ BIOLOGICKÉ NEBEZPEČÍ. Přečtěte si bezpečnostní informace o biologickém nebezpečí na stránce tohoto výrobku na adrese [thermofisher.com](http://thermofisher.com). Noste vhodné ochranné brýle, oděv a rukavice. |

# Informace o výrobku

## Popis výrobku

Katarální horečka ovcí (bluetongue) je nekontagiózní infekční onemocnění ovcí přenášené hmyzem, které je zařazeno na seznam A Mezinárodního úřadu pro nákazy zvířat (International Office of Epizootics). Je způsobena infekcí virem katarální horečky ovcí Bluetongue (BTV), který patří do čeledi Reoviridae, rodu *Orbivirus*. K dnešnímu dni bylo identifikováno 35 různých sérotypů BTV.

BTV je v zásadě **považován za nebezpečný** **pro** **ovce**: vede k značné nemocnosti a vysoké úmrtnosti. Virus infikuje také **skot, kozy a ostatní volně žijící přežvýkavce,** ale jen zřídka vede u těchto druhů ke klinickým projevům (Lefèvre a Desoutter, 1998).

Virus se téměř vždy přenáší kousnutím infikované, krev sající malé mušky z čeledi Ceratopogonidae, rodu *Culicoides*. Existuje více než 1 400 druhů *Culicoides*, ale ne všechny jsou schopny virus přenášet. Muška *Culicoides* se infikuje po požití krve infikovaného zvířete, poté se virus reprodukuje, dokud nedosáhne dostatečného titru, který umožňuje přenos na další náchylná zvířata.

Souprava **Applied Biosystems™ VetMAX™ BTV NS3 All Genotypes Kit** je molekulárně diagnostický nástroj pro stanovení viru BTV. Slouží ke specifické detekci 1 až 27 genotypů viru BTV pomocí reverzní transkripční PCR v reálném čase. Nedetekuje virus EHDV (Epizootic Hemorrhagic Disease Virus), příbuzný viru BTV.

Každý vzorek RNA je analyzován v jedné jamce: stejná jamka je použita ke specifické detekci virové RNA viru BTV a IPC (Internal Positive Control –⁠ interní pozitivní kontroly). Pozitivní IPC znamená jak úspěšnou izolaci, tak i nepřítomnost inhibitorů PCR ve vzorku.

Tuto soupravu lze použít pro virovou RNA izolovanou z plné **krve** (v EDTA zkumavkách), **sleziny** nebo orgánů **potracených zvířat**.

Kompletní protokoly pro izolaci virové RNA z těchto matric jsou k dispozici na vyžádání od technické podpory.

## Obsah soupravy a skladování

Souprava **VetMAX™ BTV NS3 All Genotypes Kit** obsahuje složky, které lze použít pro detekci BTV i IPC. Po obdržení by měla být souprava skladována neotevřená při teplotě **−30 °C až −10 °C.** Po prvním použití se řiďte doporučeními pro skladování jednotlivých složek, které jsou uvedené v následující tabulce:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Složka | Popis | Objem  (100 testů) | Skladování | |
| Po obdržení | Po prvním použití |
| 3 ‑ Mix BTVNS3  (Zelená zkumavka) | Mix pro TaqMan™ RT‑PCR. Obsahuje:   * Detekční systém pro cílové struktury BTV: přední (forward) primer a zadní (reverse) primer a dále sondu TaqMan™ označenou symbolem FAM™ ‑ NFQ (NFQ = nefluorescenční zhášedlo). * Detekční systém pro IPC: přední (forward) a zadní (reverse) primery a sondu TaqMan™ označenou symbolemVIC™ ‑ TAMRA™. * Pufr, reverzní transkriptáza a enzym pro PCR v reálném čase. | 2× 1 000 µl | **−**30 °C až **−**10 °C | **−**30 °C až **−**10 °C |
| 4a ‑ EPC BTVNS3 (Hnědá zkumavka) | Externí pozitivní kontrola:  Pozitivní kontrola pro BTV. Při RT‑PCR v reálném čase se k denaturaci a následné amplifikaci používá již izolovaná nukleová kyselina. | 2× 90 µl | **−**30 °C až **−**10 °C | **−**30 °C až **−**10 °C |

POZNÁMKA: 3 – Mix BTVNS3 doporučujeme skladovat v alikvotech (minimální objem 50 µl), aby by nebyly nutné více jak 3 cykly zmražení‑rozmražení.

## Izolační a amplifikační kontroly

Souprava **VetMAX™ BTV NS3 All Genotypes Kit** obsahuje jednu kontrolu použitou k ověření amplifikace virové RNA:

### 4a ‑ EPC BTVNS3: positive control of BTV (pozitivní kontrola pro BTV)

Pozitivní kontrola, **již izolovaná,** pro amplifikaci během RT‑PCR v reálném čase.

Pozitivní výsledek v rámci specifikovaného rozsahu Ct umožňuje ověřit amplifikaci cílové struktury BTV pomocí RT-PCR v reálném čase.

Ověření izolace nukleových kyselin pro každý vzorek se provádí detekcí **endogenní IPC** (Internal Positive Control – interní pozitivní kontroly) přítomné **v každém vzorku**.

Pozitivní výsledek IPC pro daný vzorek validuje izolaci vzorku, zda je vzorek pozitivní nebo negativní pro zkoumaný patogen, a zároveň umožňuje vyloučit falešně negativní výsledky způsobené inhibicí PCR.

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

### NCS: negative extraction control (NCS: negativní kontrola izolace)

Tato kontrola sestává z vody bez DNázy/RNázy nebo ze vzorku, o němž je známo, že neobsahuje cílový patogen, a prochází stejnou úpravou (izolace nukleových kyselin a RT‑PCR v reálném čase) jako vzorky.

Negativní výsledek pro BTV a endogenní IPC potvrzuje nepřítomnost kontaminace během izolace a RT‑PCR v reálném čase.

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

Tato kontrola sestává z 20 µl směsi pro RT‑PCR v reálném čase a 5 µl vody bez DNázy/RNázy a prochází cyklem RT‑PCR v reálném čase.

Negativní výsledek pro BTV a IPC potvrzuje nepřítomnost kontaminace během přípravy reakce RT‑PCR v reálném čase.

## Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky

Pokud není uvedeno jinak, jsou všechny materiály k dispozici na stránce [thermofisher.com](http://thermofisher.com/).

* Vysoce přesné mikropipety (rozmezí od 1 μl do 1 000 μl) s **filtrovanými** špičkami bez DNázy/RNázy
* Voda bez DNázy/RNázy
* 1X TE pufr
* 1X PBS pufr
* **Topný blok** s teplotou až **95 °C**
* **Termocykler pro PCR** v reálném čase schopný detekovat následující fluorofory:
* **FAM™** (maximální emise: λ 515 nm)
* **VIC™** (maximální emise: λ 554 nm)
* Spotřební materiál potřebné optické kvality kompatibilní s termocyklerem:
* 96jamkové PCR destičky, PCR stripy (8 nebo 12 jamek), mikrozkumavky nebo kapiláry
* Vhodné kryty destiček nebo víčka pro zakrytí

# Postup analýzy

Reakční objem RT‑PCR v reálném čase je 25 µl:

* **3 ‑ Mix BTVNS3**: 20 µl na jednu reakci
* **Izolovaná RNA:** 5 µl na jednu reakci

## Izolace virové RNA

RNA musí být izolována ze vzorků před RT‑PCR v reálném čase.

POZNÁMKA: Další informace o kompatibilních a validovaných metodách izolace pro soupravu VetMAX™ BTV NS3 All Genotypes Kit vám poskytne technická podpora.

## Denaturace RNA

1. Přidejte denaturovanou RNA do jamek PCR destičky nebo stripu. U všech reakcí zahrňte 10% rezervu izolované RNA, abyste zajistili, že po denaturaci bude přítomno dostatečné množství RNA.
2. Jamky s RNA uzavřete.
3. Zahřívejte po dobu 3 minut na teplotu mezi **+92 °C a +98 °C** v termocykleru nebo v topném bloku.
4. Denaturovanou RNA skladujte až do použití při teplotě mezi **+2 °C a +8 °C** na drceném ledu nebo v chladicím bloku.

## Příprava RT‑PCR v reálném čase

Vytvořte plán analýzy pro distribuci směsí a vzorků. Je-li to možné, uchovávejte pozitivní kontrolu (EPC) odděleně od ostatních vzorků.

Rozmrazte směs **3 ‑ Mix BTVNS3** při teplotě mezi **+2 °C a +8 °C** **na ledu** nebo ve stojanu v chladničce.

Zhomogenizujte zkumavku se směsí **3 ‑ Mix BTVNS3** jemným mícháním a poté krátce odstřeďte.

**20 µl** směsi **3 ‑ Mix BTVNS3** přidejte do každé jamky na použité PCR destičce, PCR stripu či kapiláře.

Přidejte RNA ze vzorků a kontrol do roztoku směsi pro RT‑PCR v reálném čase podle následujícího, předem nastaveného plánu analýzy:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Typ analýzy | Složka | Objem vzorku |
| Vzorek pro analýzu | RNA izolovaná ze vzorku a denaturovaná | 5 µl |
| Positive amplification control (Pozitivní amplifikační kontrola) | Denaturovaná 4a ‑ EPC BTVNS3 | 5 µl |
| Negative extraction control (Negativní kontrola izolace) (NCS) | Izolovaná a denaturovaná NCS | 5 µl |
| Negative amplification control (Negativní amplifikační kontrola) (NC) | Voda bez DNázy/RNázy | 5 µl |

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

## Amplifikace při RT‑PCR v reálném čase

1. Na termocykleru nastavte následující detektory:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Reportér | Zhášedlo |
| BTV | FAM™ | NFQ (nefluorescenční zhášedlo) |
| IPC BTV | VIC™ | TAMRA™(1) |
| Pasivní reference: ROX™(1) | | |

(1) Fluorofory TAMRA™ a ROX™ je nutné zavést pro analýzu RT‑PCR v reálném čase, pokud je termocykler schopen je detekovat. U všech ostatních termocyklerů absence schopnosti detekovat tyto fluorofory analýzu RT‑PCR v reálném čase nezhoršuje.

1. Nastavte **BTV** a **IPC BTV** detektory pro každou jamku používanou v analýze.
2. Pro analýzu nastavte následující programy RT‑PCR v reálném čase:

Tabulka 1  Standardní metoda (pro použití se vzorky purifikovanými pomocí standardního skriptu na přístroji KingFisher™)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Opakování kroků | Teplota | Doba trvání |
| Krok 1 | × 1 | 45 °C | 10 minut |
| Krok 2 | × 1 | 95 °C | 10 minut |
| Krok 3 | × 40 | 95 °C | 15 sekund |
| 60 °C(1) | 45 sekund |

(1) Sběr dat fluorescence během 45sekundové fáze při teplotě 60 °C

Tabulka 2  Expresní metoda (pro použití se vzorky krve purifikovanými pomocí expresního skriptu na přístroji KingFisher™)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Opakování kroků | Teplota | Doba trvání |
| Krok 1 | × 1 | 48°C | 5 minut |
| Krok 2 | × 1 | 97 °C | 5 minut |
| Krok 3 | × 40 | 97 °C | 2 sekundy |
| 60 °C(1) | 35 sekund |

(1) Sběr dat fluorescence během 35sekundové fáze při teplotě 60 °C

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

# Interpretace výsledků

## Analýza nezpracovaných dat

Při analýze nezpracovaných dat se řiďte doporučeními výrobce termocykleru.

1. Prahové linie nastavte pro každou cílovou strukturu zvlášť.

Výsledky interpretujte na základě hodnot Ct vzorků pro každý detektor podle následujících doporučení.

## Validace

Test je validován, pokud jsou splněna následující kritéria:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Detektor BTV | Detektor IPC BTV | Validace |
| EPC BTVNS3 | Ct = Ct QC BTV „4a ‑ EPC BTVNS3“ ± 3Ct(1) | Ct < 40 nebo Ct > 40(2) | Validováno pro RT-PCR |
| NCS | Ct > 40 | Ct > 40 | Validováno pro izolaci |
| NC | Ct > 40 | Ct > 40 | Validováno pro reagencie RT-PCR |

(1) Viz hodnoty uvedené pro „EPC“ v certifikátu o analýze skupiny použité pro daný test.

(2) Hodnota IPC v EPC by se neměla použít k validaci testu.

## Interpretace výsledků

POZNÁMKA: Pro použití soupravy při diagnostických postupech ve Francii platí zvláštní požadavky, viz příloha A.

Pro každý analyzovaný vzorek by měly být výsledky interpretovány takto:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Detektor BTV | Detektor IPC BTV | Interpretace |
| Ct < 40 | Ct < 40 nebo Ct > 40 | BTV detekován |
| Ct > 40 | Ct < 40 | BTV nedetekován |
| Ct > 40 | Ct > 40 | Nevalidováno(1) |

(1) Vzorek bude vrácen jako nevalidovaný z důvodu negativní IPC.

### Opakované testování vzorků s neplatnými výsledky

Pokud je u vzorku získán neplatný výsledek, doporučujeme provést jeden z následujících postupů podle kvality eluátu RNA.

|  |  |
| --- | --- |
| U… | Proveďte… |
| Eluáty, které se snadno pipetují (nízká viskozita) | 1. Zřeďte eluát RNA v 1X TE pufru v poměru 1 : 5. 2. Denaturujte naředěnou RNA po dobu 3 minut při teplotě 92 °C až 98 °C. 3. Zopakujte postup RT-PCR v reálném čase s 5 µl denaturované RNA a interpretujte výsledky podle pokynů.  * Pokud je výsledek RT-PCR v reálném čase pozitivní nebo negativní na BTV a výsledek IPC je přijatelný (Ct IPC < 35), je výsledek validován. * Pokud výsledek RT-PCR v reálném čase zůstane neplatný (Ct IPC ≥ 35), zřeďte vzorek v 1X PBS pufru v poměru 1 : 2 a postup izolace nukleových kyselin opakujte. |
| Eluáty, které se obtížně pipetují (vysoká viskozita) | 1. Zřeďte vzorek RNA v 1X PBS pufru v poměru 1 : 2. 2. Zopakujte postup izolace nukleových kyselin. 3. Denaturujte eluát RNA po dobu 3 minut při teplotě 92 °C až 98 °C. 4. Zopakujte postup RT-PCR v reálném čase s 5 µl denaturované RNA a interpretujte výsledky podle pokynů.  * Pokud je výsledek RT-PCR v reálném čase pozitivní nebo negativní na BTV a výsledek IPC je přijatelný (Ct IPC < 35), je výsledek validován. * Pokud výsledek RT-PCR v reálném čase zůstane neplatný (Ct IPC ≥ 35), zopakujte analýzu na novém vzorku. |

# Příloha A – Další požadavky platné ve Francii

## Výrobek je pro své použití ve Francii registrován u francouzské národní referenční laboratoři Anses Maisons-Alfort. Vztahují se na něj následující zvláštní požadavky:

### Izolační a amplifikační kontroly

V rámci akreditace COFRAC v souladu s normou NF U47-600-1 se doporučuje použít v každé sérii izolace interní referenční materiál, označovaný také jako „sentinel“, pro validaci kroků izolace, purifikace a amplifikace. Tento sentinel musí být připraven podle popisu v příloze B normy NF U47-600-1 a je třeba jej zpracovat jako vzorek nebo jako EPC.

### Interpretace výsledků

Francouzská národní referenční laboratoř vyžaduje opakované testování všech vzorků vykazujících IPC s hodnotou Ct ≥ 35 (viz „Opakované testování vzorků s neplatnými výsledky“).

# Dokumentace a podpora

## Zákaznická a technická podpora

Technická podpora: navštivte [thermofisher.com/askaquestion](http://www.thermofisher.com/askaquestion)

Navštivte [thermofisher.com/support](http://www.thermofisher.com/support) pro nejnovější služby a podporu, včetně informací o:

* Mezinárodních kontaktních telefonních číslech
* Objednávkové a webové podpoře
* Uživatelských příručkách, manuálech a protokolech
* Osvědčení o analýze
* Bezpečnostních listech (BL, známé také jako MSDS)POZNÁMKA: Bezpečnostní listy pro reagencie a chemikálie od jiných výrobců získáte od jejich výrobce.

## Omezená záruka na výrobek

Společnost Life Technologies Corporation a/nebo její pobočky poskytují záruku na své výrobky podle ustanovení ve smluvních podmínkách pro prodej společnosti Life Technologies, které naleznete na webových stránkách společnosti Life Technologies na adrese [www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html](http://www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html). Máte-li jakékoli dotazy, kontaktujte prosím společnost Life Technologies na adrese [thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support).

|  |  |
| --- | --- |
| Manufacturer.png | Laboratoire Service International (LSI) | 6 Allée des Écureuils | Parc Tertiaire du Bois-Dieu | 69380 Lissieu, Francie |

Přeloženo z anglického publikace č. MAN0008222 Rev. C.0.

Informace v této příručce se mohou bez upozornění změnit.

PROHLÁŠENÍ: DO ROZSAHU POVOLENÉHO ZÁKONEM SPOLEČNOST LIFE TECHNOLOGIES A/NEBO JEJÍ POBOČKY NERUČÍ ZA SPECIÁLNÍ, NÁHODNÉ, NEPŘÍMÉ, TRESTNÍ, NÁSOBNÉ NEBO NÁSLEDNÉ ŠKODY VE SPOJENÍ S TÍMTO DOKUMENTEM NEBO PLYNOUCÍ Z NĚJ, VČETNĚ JEHO POUŽÍVÁNÍ.

Historie revizí publikace č. MAN0008222 (anglický)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Revize | Datum | Popis |
| C.0 | 23. února 2021 | * Aktualizace se zařazením nového expresního tepelného protokolu. * Aktualizace části „Opakované testování vzorků s neplatnými výsledky“. * Aktualizace části „Popis výrobku“. * Aktualizace informací o omezené licenci. |
| B.0 | 21. listopadu 2017 | Doplněna příloha A: „Další požadavky platné ve Francii“. |
| A.0 | 23. června 2017 | Dokument aktualizován na aktuální šablonu dokumentu a byla provedena s tím související aktualizace záruky, ochranných známek a log. |
| 1.0 | 21. května 2013 | Výchozí pro historii revizí |

Důležité informace o licencích: Na tyto výrobky se může vztahovat jedna nebo více licencí k omezenému použití. Používáním těchto výrobků přijímáte smluvní podmínky všech příslušných licencí k omezenému použití.

©2022 Thermo Fisher Scientific Inc. Všechna práva vyhrazena. Není-li uvedeno jinak, všechny ochranné známky jsou vlastnictvím společnosti Thermo Fisher Scientific a jejích přidružených společností. TaqMan je registrovaná obchodní značka společnosti Roche, používaná na základě povolení a licence.