REALPCR BVDV RNA Test

Real-time PCR detekce virové RNA viru bovinní diarey

**REALPCR\* BVDV RNA Test
Pouze pro veterinární užití**

**Název a zamýšlené užití**

RealPCR BVDV RNA test se užívá k detekci RNA viru bovinní virové diarey (BVDV) a BDV viru, extrahované ze vzorků výřezů tkáně z ušního boltce, krve (EDTA), séra, plazmy, mléka nebo tkáně a zesílené použitím testovacího systému IDEXX RealPCR. Vzorky lze testovat jako směsné z až 50 vzorků EDTA krve, plazmy nebo séra, z až 25 výřezů tkáně z ucha a až z 500 vzorků mléka (bazénové vzorky).

**Obecné informace**

Virus bovinní virové diarey a BDV virus jsou příslušníci rodu Pestivirus z čeledi Flaviviridae. BVDV je jedním z nejvýznamnějších patogenních virů dobytka, způsobujících značné ztráty v mléčném a masném průmyslu po celém světě. Virus prostupuje u nakažených březích krav přes placentu a způsobuje reprodukční ztráty v podobě abortů, mrtvě narozených telat nebo telat, která uhynou záhy po narození. Některá z přeživších telat jsou k viru imunotolerantní; tato zvířata pak po celý svůj život vylučují značné množství infekčního viru. BDV způsobuje podobný syndrom u malých přežvýkavců.
Pro přerušení cyklu infekce ve stádech je důležité identifikovat perzistentně infikovaná zvířata.

Testovací systém IDEXX RealPCR je modulární formát, který páruje cílové mixy specifické pro onemocnění se standardizovaným mixem DNA nebo RNA a jedním sdruženým pozitivním kontrolním vzorkem. Činidla jsou balena jednotlivě a prodávány zvlášť, což umožňuje flexibilní zacházení.

RealPCR BVDV RNA Mix (BVDV RNA Mix) obsahuje primery a sondy pro detekci BVDV a BDV RNA po zesílení pomocí RealPCR RNA Master Mixu (RNA MMx). Test probíhá jako jednozkumavková reakce reverzní transkriptázy a polymerázy. Vnitřní kontrola testu je založena na detekci endogenní bovinní RNA přítomné ve vzorku a v protokolu je uváděna jako vnitřní kontrolní vzorek (ISC). Detekce endogenní RNA v kontrolních vzorcích pro přidávání, extrakci a amplifikaci vzorků. Primery a sondy pro detekci vnitřní kontroly jsou obsaženy v BVDV RNA mixu. K dispozici je také volitelná vnitřní pozitivní kontrola - RealPCR Internal Positive Control (IPC ≥ v1.0), kterou je vhodné použít tehdy, pokud je endogenní hostitelská RNA obsažena v malém množství, nebo pokud je nepravděpodobné, že bude po extrakci přítomna. ISC, obsažená v BVDV RNA mixu je specifická pro skot. Následně pak RealPCR IPC musí být použita k testování malých přežvýkavců. IPC obsahuje syntetickou verzi ISC RNA a proto je kompatibilní s BVDV RNA mixem. Pokyny naleznete v příbalové informaci k vnitřní pozitivní kontrole RealPCR Internal Positive Control (99-56330).

**Materiál a skladování**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Identifikace/obecné informace | Barva víčka | Počet | Skladování | Počet cyklů zamražení/rozmražení |
| 100 testů | Při uskladnění | Po rekonstituci |
| **RealPCR BVDV RNA Mix (BVDV RNA Mix), sušený** | Žlutá | 1 x 1,0 ml | –25 až 8°C | –25 až – 15°C | ≤6 |
| 99-56610 | Rekonstituujte na 1 ml v PCR vodě. Skladujte BVDV RNA Mix ve tmě. Datum exspirace na lahvičce platí jak pro suchou, tak pro rekonstituovanou formu. Popisek na zkumavce s BVDV RNA mixem uvádí verzi PC, která je kompatibilní s tímto cílovým mixem. Např. PC ≥ v1,4 znamená, že mix lze použít s verzemi PC od 1,4 výše.  |
| **RealPCR RNA Master Mix (RNA MMx)**99-56280 | Černá | 1 x 1,0 ml | –25 až–15°C(dlouhodobé) | N/A | ≤6 |
| Koncentrovaný master mix včetně reverzní transkriptázy a hot-start polymerázy vhodné pro použití s RNA cílovými mixy v systému IDEXX RealPCR. RNA MMx je viskóznější než většina master mixů - doporučení pro správné zacházení najdete v sekci Postup. Pro normalizaci objemových nepřesností bylo přidáno referenční barvivo (ROX). Chraňte RNA MMx před světlem.  |
| **RealPCR pozitivní kontrola, sušený (PC)** 99-56310 | Modrá | 1 x 500 μl | –25 až 8°C | –25 až –15°C | ≤6 |
| Rekonstituujte na 500 μL v PCR vodě. PC obsahuje všechny IDEXX RealPCR a ISC cíle (včetně cíle pro BVDV) a je určena pro použití se všemi IDEXX RealPCR cílovými mixy. Datum exspirace na lahvičce platí jak pro suchou, tak pro rekonstituovanou formu. PC má přiděleno číslo verze (např. v1.3). Pokud se do produktové linie RealPCR přidávají nově vyvinuté cílové mixy, cílové sekvence jsou přidány k PC a zvýší se číslo verze PC (např. v1.3 je aktualizována na verzi v1.4). PC obsahuje jedinečnou podpisovou sekvenci IDEXX, kterou lze použít k monitoringu PC kontaminace pracovních prostor. Laboratořím, které chtějí monitorovat PC kontaminaci, je k dispozici zvláštní cílový mix (RealPCR PC Tracker DNA Mix a RealPCR DNA MMx) pro tyto účely. |
| **RealPCR PCR voda** 99-56350 | Průhledná | 2 x 1,0 ml | –25 až 8°C | N/A |
| PCR voda má schválenou dostatečnou kvalitu pro reverzní transkripci - použití pro PCR (RT-PCR). Používá se k rekonstituci činidel testu RealPCR. Dále se používá jako PCR negativní kontrola při každém opakování testu. Nepřemisťujte lahvičky PCR vody mezi jednotlivými pracovními prostorami. Pro zamezení rizika kontaminace je vyžadována vlastní lahvička pro každé pracoviště.  |

**Poznámka:** Popis symbolů použitých v této příbalové informaci najdete v tabulce na konci.

**Potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy**

• Komerční RNA extrakční kit nebo IDEXX RealPCR - rychlý lytický pufr.

• Volitelné—1M dithiothreitol (DTT)

• Volitelné—centrifuga s rotorem a adaptéry pro vícejamkové destičky

• Mikrocentrifuga pro 2 ml mikrozkumavky schopná dosáhnout 1500 – 3000 x g

• Vhodné prostředky osobní ochrany (např. rukavice, laboratorní plášť)

• Pipetovací špičky nekontaminované nukleázou, s filtrem proti vzniku aerosolu

• Sterilní mikrozkumavky pro přípravu PCR mixu

• Pipety (5–1000 μl); zvlášť vyčleněné pipety pro přípravu PCR mixu

• 96- nebo 384-jamkové PCR destičky a optický adhezivní film/kryty destiček

• Real-time PCR přístroj (Applied Biosystems 7500, Applied Biosystems ViiATM 7, Agilent Mx3000P, Agilent Mx3005P, Agilent AriaMx, Bio-Rad CFX96 Touch, Applied Biosystems QuantStudio Flex, QIAGEN Rotor-Gene (pouze 72 rototů), Roche LightCycler 480 nebo ekvivalentní).

Poznámka - přístroj Roche LC480 vyžaduje dodatečnou kalibraci a nastavení softwaru. Technická podpora IDEXX vám může poskytnout instrukce k použití tohoto přístroje společně s činidly RealPCR.

**Laboratorní postupy a upozornění**

• Nepoužívejte činidla po uplynutí data exspirace.

• Celá procedura musí být provedena v prostředí bez kontaminace nukleázami.

• Při práci s činidly a nukleovými kyselinami noste nepudrované rukavice.

• Pro zamezení křížové kontaminaci používejte při veškerém pipetování špičky nekontaminované nukleázami a s filtrem proti vzniku aerosolu a fyzicky od sebe oddělte pracoviště, kde probíhá extrakce/ zpracování nukleových kyselin, příprava PCR a PCR.

**Rekonstituce suchých komponentů**

Rekonstituujte BVDV RNA Mix a pozitivní kontrolní vzorek pipetováním PCR vody do objemu vyznačeného na etiketě komponentu. Nechte odstát při 18 až 26°C po dobu nejméně 10 minut, před použitím promíchejte a krátce mikrocentrifugujte. Po rekonstituci BVDV mixu a pozitivního kontrolního vzorku roztoky podle potřeby rozdělte a skladujte zmrazené. Používáte-li zmražené komponenty, nechte je 15 - 30 minut roztát při teplotě 18 až 26°C, jemně promíchejte a krátce mikrocentrifugujte (~1,500 – 3,000 × g).

**Skladování vzorků**

Krev, sérum a plazmu lze skladovat při teplotě 2 - 8°C až 7 dní; sérum a plazmu lze zmrazit při <–15°C. Výřezy tkáně z ušního boltce skladujte před extrakcí a pro dlouhodobější uchování suché při teplotě <–15°C. Pro dlouhodobé uchovávání mléka vzorek promíchejte a rychle zmrazte malé množství (< 1ml) pro omezení separace tuku. Skladujte při <–15°C.

**Extrakce RNA**

BVDV RNA mix byl validován pro použití s komerčními extrakčními metodami vypsanými níže. Jiné metody extrakce nebo lýzi lze po validaci laboratoří použít také. Pokud neprovádíte testování ihned po RNA extrakci, skladujte přečištěnou RNA při <–15°C. Mezi vzorky se doporučuje zařadit také negativní extrakční kontrolu (falešný vzorek).

**Doporučené komerční metody extrakce**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Krev (EDTA), Plazma, Sérum | Tkáň z ušního boltce(1–3 mm) | Tkáň | Mléko |
| Velikost sdruženého vzorku | ≤50 | ≤25 | N/A | ≤500 |
| RealPCR \*DNA/RNA Magnetic Bead Kit, IDEXX | √ | √ | √ | √ |
| RealPCR\* DNA/RNA Spin Column Kit, IDEXX | √ | √ | √ | √ |
| QIAamp Viral RNA, QIAGEN | √ |  |  |  |
| RNeasy Mini Kit, QIAGEN |  | √ | √ |  |
| NucleoMag VET magnetický extrakční kit, Macherey-Nagel | √ | √ |  | √ |
| MagMAX Viral RNA izolační kit, ThermoFisher | √ |  |  | √ |
| RealPCR\* lytický pufr, IDEXX |  | √ |  |  |

Detailní informace o produktových kódech a verzích brožur ke komerčním extrakčním kitům poskytujeme v Technickém manuálu RealPCR - sekce Extrakční metody. Pro potřebné materiály, které nenaleznete v manuálu, využijte instrukce poskytované jednotlivými výrobci.

**IDEXX RealPCR DNA/RNA Spin Column Kit a RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit**

Extrahujte vzorky tak, jako je napsané v manuálu. Žádné odchylky od protokolu zde nejsou. Při sdružování vzorků smíchejte před započetím extrakcí stejné množství ze vzorků. Vzorky tkáně homogenizujte v RealPCR Tissue Lysis pufru (REF 99-56107, TL-60)/DTT roztok (40 μl 1M dithiothreitolu (DTT) na 1 ml TL-60). Poznámka: TL-60 se dodává samostatně.

**Qiagen, QIAamp Viral RNA**

Extrahujte vzorky tak, jak je popsáno v QIAamp RNA Mini příručce o purifikaci virové RNA z plazmy, séra, bezbuněčných tělních tekutin a supernatantů buněčných kultur (spin protokol). Nejsou zde žádné odchylky od protokolu.

Při sdružování vzorků smíchejte před započetím extrakce vždy stejná množství z maximálně 50 vzorků.

**Qiagen RNeasy Mini Kit**

Výřezy tkáně z ušního boltce

Extrahujte vzorky podle instrukcí v RNeasy Mini příručce. Řiďte se protokolem Purifikace celkové RNA ze zvířecí tkáně (RNeasy Mini Kit). Tkáň není třeba homogenizovat. Připravte si RLT/DTT roztok smícháním 14 μl 1M dithiothreitolu (DTT) na 350 μl RLT. Před extrakcí přidejte 350 μl RLT/DTT roztoku ke každému výřezu tkáně, 10 sekund třepejte na vortexu a nechte alespoň 30 minut namáčet.
Přidejte 350 μl 70% etanolu a okamžitě protřepejte na vortexu (15 vteřin), pak přidejte roztok do RNeasy spin column zařízení. Pokračujte v protokolu podle pokynů v RNeasy Mini příručce. Žádné další odchylky od protokolu zde nejsou. Při sdružování vzorků smíchejte stejné podíly roztoku, ve kterém se namáčela tkáň, z maximálně 25 vzorků. Individuální vylouhovanou tkáň si uchovejte pro potvrzení pozitivního sdruženého vzorku.

Tkáň

Extrahujte vzorky podle instrukcí v RNeasy Mini příručce. Řiďte se protokolem Purifikace celkové RNA ze zvířecí tkáně (RNeasy Mini Kit). Žádné další odchylky od protokolu zde nejsou.

**Macherey-Nagel NucleoMag VET magnetický extrakční kit**

Krev, sérum, plazma

Použijte 200 μl vzorku. Extrahujte vzorky podle pokynů v uživatelském manuálu NucleoMag VET Viral RNA/DNA Isolation. Nejsou zde žádné odchylky od protokolu. Při sdružování vzorků smíchejte před extrakcí stejné podíly z maximálně 50 vzorků.

Výřezy tkáně z ušního boltce

Připravte si RA1/DTT roztok přidáním 250 μl RA1 pufru a 10 μl 1M DTT pro každý vzorek k extrakci a pro negativní kontrolní vzorek (pozn. – Pufr RA1 se dodává zvlášť; informace o objednávkách najdete v uživatelském manuálu NucleoMagVET).

Přidejte 250 μl RA1/DTT ke každému vzorku tkáně. Třepejte na vortexu 10 vteřin, namáčejte 30 minut při teplotě 18 - 26°C, třepejte znovu 10 vteřin. Použijte 200 μl roztoku, ve kterém se namáčela tkáň. Extrahujte vzorky podle pokynů v uživatelském manuálu NucleoMag VET Viral RNA/DNA Isolation. Nejsou zde žádné odchylky od protokolu. Při sdružování vzorků smíchejte před extrakcí stejné podíly roztoku, ve kterém se namáčela tkáň, z maximálně 25 vzorků. Individuální vzorky tkáně si uchovejte pro potvrzení výsledků pozitivního směsného vzorku.

**ThermoFisher MagMAX - kit na izolaci virové RNA**

Extrahujte vzorky podle popisu v uživatelském manuálu MagMAX-96 . Nejsou zde žádné odchylky od protokolu. Při sdružování vzorků smíchejte před extrakcí stejná množství z až 50 vzorků.

**IDEXX RealPCR rychlý lytický pufr ( 99-56370)**

Metoda rychlé lýzi je detailně popsána v příbalové informaci RealPCR pufru. Při sdružování vzorků smíchejte stejná množství finálního lyzovaného roztoku z až 25 vzorků.

**Postup testu**

1 - Příprava PCR mixu.

• Promíchejte rozmražený RNA MMx obracením, nebo jemným třepáním.

• RNA MMx je viskózní roztok; vždy ho pipetujte pomalu.

• Pro přípravu PCR mixu přidejte pro každou reakci 10 μl BVDV RNA mixu a 10 μL RNA MMx.

• Při přípravě PCR mixu nejprve pipetujte BVDV RNA mix do zkumavky, pak přidejte RNA MMx. Několikrát naberte a vypusťte obsah pipety pro vypláchnutí špičky od MMx.

• Roztok jemně protřepejte na vortexu pro dokonalé smíchání všech složek.

• Pomalu pipetujte PCR mix do PCR destičky. Během 20 minut destičku použijte, nebo ji můžete při teplotě 2 -8°C skladovat až 4 hodiny. PCR mix lze skladovat při teplotách –25 až –15°C až 2 týdny. Chraňte před světlem.

2 - Pipetujte 20 μl PCR mixu do určených jamek na vícejamkové destičce.

3 - Přidejte do každé jamky 5 μl RNA ze vzorku. Finální reakční objem je 25 μl.

4 - Ke každému opakování testu přidejte pozitivní kontrolní vzorek (5 μl) a PCR negativní kontrolní vzorek (5 μl PCR vody).

5 - Zakryjte destičku a krátce odstřeďujte, je- li to nutné, aby se obsah usadil a vyprchaly vzduchové bublinky.

6 - Nastavte teplotní cyklovač na program IDEXX RealPCR - standardní DNA/RNA cyklus.

**Nastavení reportéru a tlumiče (zhášeče)**

Cíl Reportér Tlumič (zhášeč)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| BVDV/BDV | FAM | BHQ (žádný) |
| Vnitřní kontrola (ISC/IPC) | HEX(VIC) | BHQ (žádný) |
| Pasivní reference | ROX | N/A |

RealPCR\* standardní DNA/RNA program

 Teplota Čas Cykly

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Reverzní transkripce (RT) | 50°C  | 15 min.  | 1 |
| Denaturace | 95°C | 1 min. | 1 |
| Amplifikace\*\* | 95°C60°C | 15 s.30 s. | 45 |

\*\*Ujistěte se, že přístroj je nastaven pro zaznamenávání fluorescence následně po amplifikaci při 60°C.

7 - Analýza dat. Při nastavování přístrojového softwaru přidělte každému cíli a vnitřní kontrole specifický identifikátor.

Například pokud jsou cíle A a B na stejné destičce, jamky A musí být analyzovány nezávisle na jamkách B. Informace o analýzách dat naleznete v uživatelských manuálech konkrétních přístrojů. Pro nastavení prahu použijte nastavení Auto Ct. Na přístrojích Agilent Mx3000P a Mx3005P se ujistěte, že pro analýzu používáte metodu prahové fluorescence na základě hodnoty fluorescence pozadí. V některých případech software určí prahovou hodnotu, která je hluboko pod hodnotou pozadí a z tohoto důvodu chybí Ct hodnoty pro vzorky s typickými amplifikačními křivkami. V takovém případě je nutné manuálně upravit hodnotu prahu. Pro QIAGEN Rotor-Gene manuálně upravte hodnotu prahu nad pozadím v lineární fázi exponenciálního zesílení. Doporučení ohledně nastavení prahu najdete v pokynech od výrobce přístroje.

**Kritéria validity**

 Reakce Hodnota FAM Ct hodnota HEX (VIC) Ct

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Pozitivní kontrola | <38 | <38 |
| PCR Negativní kontrola | Žádný signál | Žádný signál |

8- Interpretace výsledků

Výsledek FAM signál HEX (VIC) signál Další charakteristiky

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| BVDV/BDV RNA detekována | Ano | Ano/Ne | Pozitivní hodnota Ct a charakteristická amplifikační křivka ve srovnání s PCR negativní kontrolou.Je očekávána amplifikační křivka vnitřní kontroly v kanálu HEX (VIC); některé silně BVDV-pozitivní RNA vzorky mohou způsobit negativní výsledek vnitřní kontroly.† |
| BVDV/BDV RNA nedetekována | Ne | Ano | Amplifikační křivka v kanále vnitřní kontroly HEX (VIC). |
| Neplatný‡ | Ne | Ne | Absence amplifikační křivky v kanálech FAM a HEX (VIC) indikuje neplatný výsledek. |

†Cílový mix je optimalizován na detekci BVDV/BDV RNA; silně pozitivní RNA vzorek může překonat detekci vnitřní kontroly.

‡Neplatný vzorek může naznačovat selhání adice, extrakce a/nebo PCR vzorku. Doporučuje se RNA pětkrát zředit v PCR vodě a otestovat znovu; neředěnou RNA použijte jako vzorek. Pokud test stále není validní, doporučuje se nová extrakce.

**Pro technickou podporu:**

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 nebo +1 207 556 4895

IDEXX Evropa Tel: +800 727 43399

Obraťte se na manažera nebo distributora společnosti IDEXX pro Vaši oblast nebo navštivte naši webovou stránku: www.idexx.com/production/contactlpd

\*IDEXX a Test With Confidence jsou ochranné známky nebo registrované ochranné známky

společnosti IDEXX Laboratories, Inc. nebo jejích přidružených společností ve Spojených státech amerických a/nebo v jiných zemích.

Barviva obsažená v tomto produktu jsou prodávána v licenci Biosearch Technologies, Inc. a chráněna v USA i na celém světě patenty již vydanými, nebo přihlášenými. Licence pokrývá pouze veterinární použití. Není určeno pro humánní in vitro diagnostiku.

Informace o patentu: idexx.com/patents

©2020 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved. (Všechna práva vyhrazena.)

**Popis symbolů**

 Kód šarže

 Sériové číslo

 Katalogové číslo

 Diagnostika in vitro

 Autorizovaný zástupce v Evropském společenství

 Pozitivní kontrolní vzorek

 Negativní kontrolní vzorek

 Použijte do

 Datum výroby

 Výrobce

 Teplotní omezení

 Čtěte návod na použití

****  Větší změna v návodu na použití

IDEXX Laboratories, Inc.

One IDEXX Drive

Westbrook, Maine 04092

USA

Vý*robce*

IDEXX Montpellier SAS

326 rue de la Galéra

34090 Montpellier

Francie

*Zástupce pro EU*

IDEXX Europe B.V.

P.O. Box 1334

2130 EK Hoofddorp

Nizozemsko