**VetMAX Schmallenberg Virus Kit**

TaqMan real‑time RT-PCR pro detekci SBV (Schmallenberského viru)

Katalogové číslo SBVS50

Pub. č. MAN0026037  Rev. B.0

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Technologie** | **Druhy** | **Nukleová kyselina izolovaná z matric** | **Typ testu** |
| Real-time RT‑PCR v reálném čase (RNA)  – Duplexní – Endogenní IPC (Internal Positive Control) | Skot  Malí přežvýkavci (ovce, kozy) | Mozková tkáň  Krev (EDTA zkumavky)  Sérum | 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

Souprava **Applied Biosystems VetMAX Schmallenberg Virus Kit** je molekulárně diagnostický nástroj pro stanovení SBV. Slouží ke specifické detekci genu S viru SBV pomocí real‑time PCR v reálném čase reverzní transkripce.

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

Soupravu lze použít k detekci virové RNA izolované z **mozkové tkáně, plné krve** odebrané do EDTA zkumavek nebo ze **séra**. Detekce virů je přednostně prováděna u mozku z potracených zvířat, virus však může být detekován i v krvi (Zdroj: FLI – Německá národní referenční laboratoř). Vzhledem k absenci dalších informací o délce viremické fáze, která se jeví jako velmi krátká (2 až 3 dny), a o lokalizaci viru v živém zvířeti, doporučujeme pracovat přednostně s virovou RNA izolovanou z mozkové tkáně.

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

## Obsah soupravy a skladování

Souprava **VetMAX Schmallenberg Virus Kit** obsahuje reagencie pro detekci v duplexu SBV a IPC. Po převzetí musí být celá souprava skladována při teplotě **−30 °C až −10 °C**. Po prvním použití složky uložte soupravu podle následujících doporučení:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Složka | Popis | Objem  (50 reakcí) | Skladování | |
| Po obdržení | Po prvním použití |
| 3 - Mix SBVS  (Zelená zkumavka) | Mix pro TaqMan RT‑PCR. Obsahuje:   * Detekční systém pro cílové struktury SBV: 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 symbolem VIC ‑ TAMRA. * Pufr, reverzní transkriptáza a PCR enzym. | 2 × 500 µl | −30 °C až −10 °C | −30 °C až −10 °C |
| 4a – EPC SBVS  (Hnědá zkumavka) | Externí pozitivní kontrola:  Pozitivní kontrola pro SBV. Sestává z již izolované nukleové kyseliny, která má být amplifikována během PCR v reálném čase. | 90 µl | −30 °C až −10 °C | −30 °C až −10 °C |

## Izolační a amplifikační kontroly

Souprava **VetMAX** **Schmallenberg Virus Kit** obsahuje jednu kontrolu použitou k ověření amplifikace virové RNA:

### 4a ‑ EPC SBVS: positive control for SBV (pozitivní kontrola pro SBV)

**Již izolovaná** pozitivní kontrola, která má být amplifikována během RT‑PCR v reálném čase.

Pozitivní výsledek v rámci specifikovaného rozsahu Ct umožňuje ověřit amplifikaci cílové struktury SBVpomocí RT‑PCR v reálném čase.

Ověření izolace nukleových kyselin pro každý vzorek se provádí detekcí endogenní **IPC** (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 umožňuje vyloučit falešně negativní výsledky a ověřit případnou inhibici.

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

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

Tato kontrola je složena z reagencií použitých při izolaci bez přidání vzorku (objem vzorku může být nahrazen pufrem použitým při přípravě vzorku nebo vodou bez DNázy/RNázy), které procházejí stejným zpracováním jako vzorky: izolací nukleových kyselin (s přídavkem IPC) a RT‑PCR v reálném čase.

Negativní výsledek pro SBV a IPCumožňuje validovat nepřítomnost kontaminace během izolace a RT‑PCR v reálném čase.

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

Jedná se o amplifikační směs, která se přidává na destičku během přípravy PCR v reálném čase společně s 5 μl vody bez DNázy/RNázy pro doplnění objemu na 25 μl.

Negativní výsledek pro SBVa IPC umožňuje validovat 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 1000 μl) s filtrovanými špičkami bez DNázy/RNázy
* DNase/RNase-free water (Voda bez DNázy/RNázy)
* 1X TE pufr
* 1X PBS pufr
* Termocykler pro PCR v reálném čase schopný detekovat následující fluorofory:
  + FAM (maximální emise: λ515 nm)
  + VIC (maximální emise: λ554 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 SBVS**: 20 μl na analýzu
* **Izolovaná RNA:** 5 μl na analýzu

## Izolace virové RNA

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

POZNÁMKA: Pro informace o metodách izolace, které jsou kompatibilní se soupravou VetMAX Schmallenberg Virus Kit a které jsou pro ni validovány, kontaktujte technickou podporu.

## Příprava reakcí RT‑PCR v reálném čase

1. Vytvořte plán analýzy pro distribuci směsí a vzorků. Je-li to možné, uchovávejte pozitivní kontrolu (EPC) odděleně od ostatních vzorků.
2. Rozmrazte **3** ‑ **Mix SBVS** při teplotě **2 °C až 8 °C** **na ledě** nebo ve stojanu v chladničce.
3. Promíchejte opatrně směs **3** ‑ **Mix SBVS** a poté krátce zcentrifugujte.
4. Přidejte **20 µl směsi 3** ‑ **Mix SBVS** do každé jamky PCR destičky, PCR stripu nebo kapiláry.
5. Přidejte RNA ze vzorků a kontrol do reakční směsi podle následujícího předem nastaveného plánu analýzy:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Typ analýzy** | **Složka** | **Objem vzorku** |
| Vzorek pro analýzu | RNA izolovaná ze vzorku | 5 µl |
| Positive amplification control (Pozitivní amplifikační kontrola) | 4a ‑ EPC SBVS | 5 µl |
| Negative extraction control (Negativní kontrola izolace) (NCS) | Izolovaná NCS | 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 pomocí RT‑PCR v reálném čase

1. Na termocykleru nastavte následující detektory:

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

(1) Fluorofory TAMRAa ROX jsou zapotřebí pro analýzu PCR v reálném čase, pokud je termocykler schopen je detekovat. U všech ostatních termocyklerů absence schopnosti detekovat tyto fluorofory nezhoršuje analýzu RT‑PCR v reálném čase.

1. Nastavte **SBV** a **SBV** **IPC** detektory pro každou jamku používanou v analýze.
2. Pro analýzu nastavte následující program 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 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
2. 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 termocykleru.

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

## Validace

Test je validován, pokud jsou splněna následující kritéria:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | SBV detektor | Detektor IPC SBV | Validace |
| EPC SBVS | Ct = Ct QC SBV 4a ‑ EPC SBVS ± 3Ct(1) | Ct < 40 nebo Ct > 40(2) | Validováno pro PCR |
| NCS | Ct > 40 | Ct < 40 | Validováno pro izolaci |
| NC | Ct > 40 | Ct > 40 | Validované PCR složky |

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

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

## Interpretace výsledků

Pro každý analyzovaný vzorek by měly být výsledky interpretovány takto:

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

(1) Vzorek bude považován za nevalidovaný z důvodu nevyhovující hodnoty IPC.

### Postup pro zacházení s nevalidovanými vzorky

1. Nevalidovaný vzorek RNA nařeďte v poměru 1 : 5 v 1X TE pufru.
2. Proveďte novou RT‑PCR analýzu s 5 μl tohoto ředění.
3. Pokud je zředěná RNA pozitivní na SBV nebo negativní na SBV s přijatelným výsledkem IPC, získaný výsledek je validní.
4. Pokud je zředěná RNA negativní na SBV s nepřijatelným výsledkem IPC, pak získaný výsledek stále není validní. V takovém případě opakujte izolaci nukleových kyselin za použití vzorku zředěného 1 : 2 v 1X PBS pufru.

# 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 chemické látky 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 francouzské publikace č. MAN0007811 Rev. C.0.

Informace v této příručce se mohou bez upozornění změnit.

Historie revizí publikace č. MAN0007811 (francouzsky)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Revize | Datum | Popis |
| C.0 | 18. prosince 2020 | Dokument aktualizován tak, aby zahrnoval nový expresní teplotní protokol a změnu počtu cyklů u standardního protokolu. |
| B.0 | 9. března 2017 | Dokument aktualizován na aktuální šablonu dokumentu a byla provedena s tím související aktualizace záruky, ochranných známek a log. |
| A.0 | Listopad 2015 | Úprava matric vzorků |
| 2.0 | Červen 2013 | Oprava ochranných známek |
| 1.0 | Duben 2013 | Nový dokument |

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.

©2020 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.