

ID Gene Bluetongue Duplex

Ref: IDBTV-50 / IDBTV-100

50/100 testů

Návod k použití



RT-qPCR test pro kvalitativní detekci RNA viru katarální horečky ovcí

Vhodné vzorky: hovězí, ovčí nebo kozí plná krev (jednotlivé nebo společné (poolované) vzorky až do 10 ks) nebo slezina

**Použití *in vitro. Veterinární přípravek. Pouze pro zvířata.***



IDvet Genetics, 310, rue Louis Pasteur – Grabels – FRANCIE

Tel:+ 33 (0)4 67 41 49 33 – Fax: + 33 (0)4 67 45 36 95, www.id-vet.com – E-mail: info@id-vet.com

**Obecné informace**

|  |
| --- |
| * **Charakteristiky**
 |
| Souprava **ID Gene Bluetongue Duplex (IDBTV)** je souprava RT-qPCR, jež amplifikuje cílovou sekvenci v genomu viru katarální horečky ovcí (BTV).Tato souprava je kvalitativní duplexní test. Současně amplifikuje cílovou RNA a exogenní vnitřní kontrolu.Souprava obsahuje cílovou pozitivní kontrolu (TPC-BTV), která se extrahuje za stejných podmínek jako vzorky, aby se ověřila extrakce a amplifikace cíle.Tuto soupravu lze použít k testování plné krve skotu, ovcí nebo koz odebrané v EDTA, a to buď jednotlivě, nebo v souborech až 10 vzorků, nebo vzorků sleziny. |
| * **Složení soupravy a podmínky skladování**
 |
| Souprava IDBTV obsahuje níže uvedená činidla: |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| ***Označení*** | ***Prvek*** | ***Objem*** | ***Popis*** |
| *TPC-BTV* | Cílová pozitivní kontrola | 550 µl1 lahvička | Inaktivovaný BTV, zředěný v matrici plné krve s negativním virem, lyofilizovaný a kalibrovaný na 10 až 100násobek detekčního limitu metody (MDL).Lyofilizovaná peleta se rekonstituuje v **550 µl** destilované vody nebo vody bez nukleázy. |
| *ARM-BTV* | Amplifikační reakční směs | 400 µl1 nebo 2 zkumavky(bílé víčko) | Reakční směs připravená k použití obsahující reverzní transkriptázu, Taq polymerázu a oligonukleotidy pro detekci BTV a exogenní necílové pozitivní kontroly. |

**Všechny komponenty by měly být skladovány při teplotě ≤ – 16 °C**. Doporučuje se připravit alikvotní části (minimálně 100 µl), aby se zabránilo vícenásobným cyklům zmrazení/rozmrazení (> 3 cykly se nedoporučují).

|  |
| --- |
| * **Nezbytné materiály, které ovšem nejsou součástí sady**
 |
| Veškerý použitý materiál by měl být v kvalitě vhodné pro molekulární biologii.**Přístroje:*** Termocykler v reálném čase s kanály schopnými snímat následující fluorofory: FAM, HEX nebo VIC a Cy5.

Příklady kompatibilních termocyklerů: CFX96, Chromo4 (BioRad), LC480 I, LC480 II, LC96 Roche, AB 7500 a Rotor-Gene Q Qiagen. Ohledně vhodnosti použití s jinými termocyklery nás prosím kontaktujte na adrese info@id-vet.com.* Ohřívací blok (např. termomixér) schopný ohřevu na 95 °C.

**Spotřební materiál:*** Přesné pipety pro dávkování objemů 1 a 1000 µl
* Filtrované hroty bez nukleázy
* 1,5 ml zkumavky
* 96jamkové PCR destičky, proužky nebo PCR mikrozkumavky (s optickou kvalitou kompatibilní s termocyklerem) a vhodné lepicí fólie nebo víčka
* Chladicí regál

**Činidla:*** Destilovaná voda nebo voda bez nukleázy (doporučeno)

**Poznámky a bezpečnostní opatření**Použitý materiál obsahuje méně než 0,1 % nebezpečných nebo karcinogenních látek, a proto nejsou vyžadovány bezpečnostní listy. Doporučuje se však přijmout příslušná bezpečnostní opatření, stejně jako u každého biochemického produktu, a nosit vhodný oděv. Uchovávejte mimo dohled a dosah dětí.**Kontrola extrakce a amplifikace** |
| * **Pozitivní kontroly**
 |
| Souprava IDBTV obsahuje následující pozitivní kontroly:* **Cílová pozitivní kontrola (TPC-BTV):**

Tato kontrola se skládá z inaktivovaného BTV zředěného v matrici plné krve s negativním virem, kalibrovaného na 10 až 100násobek MDL.**Tato kontrola se připravuje a extrahuje stejným způsobem jako vzorky**, aby se ověřila účinnost extrakce a amplifikace.* **Endogenní necílová pozitivní kontrola (NTPCen):**

Tato kontrola je konstitutivně přítomna v buňkách testovaného vzorku. Její funkcí je ověření (1) lýzy buněk a (2) amplifikace necílového genu. Potvrzuje také přítomnost buněk a poskytuje informaci o kvalitě vzorku. |

|  |
| --- |
| * **Negativní kontrola**
 |
| Doporučuje se zahrnout do každé série následující negativní kontroly:* **Negativní kontrola extrakce (NEC)**

Tato kontrola by měla být připravena a extrahována stejným způsobem jako vzorky, ale neměla by obsahovat žádnou cílovou RNA. Objem zabraný vzorkem se nahradí nereaktivní matricí nebo vodou bez nukleázy.* **Negativní kontrola amplifikace (NAC)**

Tato kontrola obsahuje 8 µl reakční směsi (ARM-BTV) a 5 µl vody bez nukleázy. Bude zahrnuta do každé zkoušky, aby se zkontrolovala přítomnost aerosolových kontaminantů.**Postup analýzy** |
| * **Extrakce virové RNA**
 |
| Virová RNA musí být ze vzorku extrahována před amplifikací pomocí RT-PCR.K tomu IDvet Genetics nabízí řadu extrakčních souprav, které jsou v souladu s francouzskou normou NF U47-600: |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***Popis*** | ***NÁZEV VÝROBKU*** | ***Kód výrobku*** |
| *Systém extrakce s magnetickými kuličkami* | Univerzální magnetická extrakční sada ID Gene | MAG 192/MAG384 |
| Souprava pro rychlou magnetickou extrakci ID Gene | MAGFAST384 |
| *Extrakční systém s kolonou* | Univerzální extrakční sada ID Gene Spin | SPIN50/SPIN250 |

Pro další informace se obraťte nainfo@id-vet.com.

|  |
| --- |
| * **Extrakce kontrol**
 |
| Objem kontroly, který se má extrahovat, je uveden v tabulce níže:**Důležité:*** Uvedené objemy jsou platné bez ohledu na extrakční systém.
* Kontroly musí být extrahovány současně se vzorky.
 |
| ***Kontrola*** | ***Objem*** |
| *TPC-BTV* | **50 µl** |

*Poznámka: Pokud se* ***NEC*** *připravuje se vzorkem s negativní matricí, postupujte podle protokolu extrakční soupravy pro předmětnou matrici.*

|  |
| --- |
| * **Příprava amplifikační reakce RT-qPCR**
 |
| 1. Připravte si experimentální plán pro analýzu vzorků a kontrol a dbejte na to, abyste pozitivní kontrolu (TPC-BTV) oddělili od ostatních vzorků.
2. Rozmrazte soupravu IDBTV, ideálně při teplotě 5 °C (± 3 °C) v chladicím boxu. Rozmrazujte při pokojové teplotě 21 °C (± 5 °C) pouze v případě, že má být směs použita ihned po rozmrazení.
3. Obsah zkumavky **ARM-BTV** homogenizujte vířením. Krátce odstřeďte.
4. Do každé jamky nalijte **8 µl přípravku ARM-BTV**. Použijte PCR proužky nebo mikrotitrační destičky přizpůsobené používanému termocykleru.
5. RNA extrahovanou ze vzorků a kontrol zahřívejte 3 minuty (+ 1 min) při 95 °C (± 2 °C), aby došlo k denaturaci dvouřetězcové RNA BTV.
6. Ihned po zahřátí uložte denaturované extrakty na led nebo při teplotě 5 °C (± 3 °C).
7. Do reakční směsi přidejte následující látky:
* 5 µl RNA extrahované z každého analyzovaného vzorku
* 5 µl RNA extrahované z TPC-BTV
* 5 µl extrahované NEC
* 5 µl vody bez nukleázy (NAC)

*Poznámka: Při distribuci vzorků se doporučuje použít chladicí stojan, aby se zachoval denaturovaný stav dvouvláknové RNA.*1. Destičku nebo proužky zakryjte vhodnou samolepicí fólií nebo krytkami.
 |
| * **Programování fáze amplifikace**
 |
| 1. Naprogramujte detektory termocykleru tak, aby pro každou jamku snímaly následující vlnové délky:
 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***Cíl*** | ***Kanál schopný zjišťovat hodnoty*** | ***Zhášeč*** |
| ***Sekvence specifická pro BTV*** | FAM | nefluorescenční\* |
| ***Sekvence specifická pro buňky NTPCen*** | VIC/HEX | nefluorescenční (kompatibilní s VIC/HEX)\* |

*Poznámka: Pro zařízení vyžadující interní referenci pro optickou kalibraci obsahuje zesilovací směs ARM-BTV ROX.*

*\*Použití zhášeče TAMRA může u některých přístrojů zlepšit analýzu dat.*

Vyberte si ze 2 různých amplifikačních programů ověřených společností IDvet Genetics:

* Standardní program (umožňuje použití PCR souprav od různých dodavatelů v jednom cyklu)

nebo

* rychlý program

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| ***Krok*** | ***Standardní program*** | ***Rychlý program*** | ***Počet cyklů*** |
| *(1) Reverzní transkripce* | 10 min. při 45 °C | 10 min. při 45 °C | 1 |
| *(2) Aktivace polymerázy* | 10 min. při 95 °C | 2 min. při 95 °C | 1 |
| *(3) Denaturace/prodloužení DNA* | 15 sec. při 95 °C60 sec. při 60 °C | 10 sec. při 95 °C30 sec. při 60 °C | 40 |

*Poznámka: Fluorescence se odečítá na konci fáze prodloužení při 60 °C.*

1. V termocykleru zadejte jeden nebo výše uvedené programy a zvolte konečný objem **13 µl na PCR**. Pokud se v jednom cyklu kombinují různé objemy, zadejte největší objem na destičce.
2. Umístěte PCR destičku, PCR proužky nebo kapiláry do termocykleru a spusťte program.

**Ověřování a interpretace výsledků**

|  |
| --- |
| * **Validace testu**
 |
| Analýza výsledků je založena na hodnotě Cq (kvantifikační cyklus) každého vzorku, kterou získají jednotlivé detektory. Cq je také známá jako hodnota Ct (prahový cyklus).Test je validován podle kritérií uvedených v tabulce níže. **Výsledky by neměly být interpretovány, pokud některé z těchto kritérií není splněno.** |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***Kontrola*** | ***Očekávaný výsledek*** | ***Kritéria přijatelnosti*** |
| *TPC-BTV* | Zjištěno u FAM a VIC/HEX | Přítomnost charakteristické křivkyViz hodnota Cq uvedená v certifikátu kontroly kvality |
| *NTPCen* | Zjištěno u VIC/HEX v každém vzorku | Přítomnost charakteristické křivky |
| *NEC* | Při použití vody nebylo zjištěno nicZjištěno u VIC/HEX, pokud byl použit vzorek negativní na virus | Celková absence charakteristické křivkyPřítomnost charakteristické křivky |
| *NAC* | Žádná detekce | Celková absence charakteristické křivky |

*Poznámka: TPC-BTV lze použít ke sledování změn analytické citlivosti, protože je kalibrován na 10 až 100násobek MDL.*

|  |
| --- |
| * **Navrhovaná interpretace výsledků**
 |
| U každého vzorku lze výsledky interpretovat podle následujících kritérií: |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| ***Vzorek*** | ***Signál BTV*** | ***Signál NTPCen*** | ***Interpretace*** |
| ***Individuální*** | Zjištěno | Zjištěno nebo nezjištěno | Zvíře pozitivní na BTV |
| Nezjištěno | Zjištěno | U zvířete nezjištěn BTV |
| Nezjištěno | Nezjištěno | Během distribuce nebo extrakce vzorku došlo k problému a/nebo byla inhibována PCR reakce |
| ***Zařazeno do skupiny*** | Zjištěno | Zjištěno nebo nezjištěno | Alespoň 1 zvíře pozitivní na BTVJe nutná individuální analýza vzorků |
| Nezjištěno | Zjištěno | Směs negativních vzorků |
| Nezjištěno | Nezjištěno | Během distribuce nebo extrakce vzorku došlo k problému / PCR reakce byla inhibována |

**Neověřené vzorky:**

* **Pokud není detekován NTPCen, ale vzorek je zjištěn jako pozitivní na BTV, považujte vzorek za pozitivní.**
* **Pokud není detekován NTPCen:**
* Problém nastal při distribuci vzorku nebo během procesu extrakce. V tomto případě je třeba znovu extrahovat vzorek.

nebo

* PCR reakce byla inhibována. V takovém případě proveďte novou amplifikaci podle níže uvedeného postupu.

**Postup, který je třeba dodržet v případě inhibování PCR reakce:**

1. Extrahovanou RNA desetkrát zřeďte ve vodě bez nukleázy (nuclease-free water).
2. Opakujte krok amplifikace na 5 µl tohoto roztoku.
3. Bude-li zjištěn NTPCen, interpretujte vzorek podle výše uvedené tabulky.
4. Nebude-li zjištěn NTPCen, vzorek znovu extrahujte, nebo jej považujte za neinterpretovatelný.

**Dokumentace a podpora**

V případě dotazů nebo požadavků na technickou podporu se obraťte na: **info@id-vet.com**. Další informace naleznete na adrese **www.id-vet.com**

**Distributor v ČR a držitel rozhodnutí o schválení:**

O.K. SERVIS BioPro, s.r.o., Bořetická 2668/1, 193 00 Praha 9, Česká republika