Souprava VetMAX™ BTV NS3 All Genotypes

Taqman® real-time RT-PCR pro detekci viru BTV (virus katarální horečky ovcí) odpovědného za katarální horečku ovcí

**Katalogové číslo** BTVNS3

**Publikace č.** MAN0008222 **Rev**. B.0

|  |
| --- |
| **DŮLEŽITÉ!** Výrobek registrovaný u Francouzské národní referenční laboratoře - 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** |
| Real-time RT-PCR (RNA)* Duplexní
* IPC endogenní
 | SkotMalí přežvýkavci (ovce, kozy) | Krev (v EDTA zkumavkách)Slezina nebo potracený plod (slezina, játra, srdce) | Individuální |

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\uzivatel\AppData\Local\Temp\FineReader11.00\media\image1.png | **VAROVÁNÍ!** Přečtěte si bezpečnostní listy (SDS) a dodržujte pokyny k manipulaci. Používejte vhodné ochranné brýle, oděv a rukavice. Bezpečnostní listy (BL) jsou k dispozici na adrese **thermofisher.com/support.** |
|  |  |
| C:\Users\uzivatel\AppData\Local\Temp\FineReader11.00\media\image2.png | **VAROVÁNÍ! POTENCIÁLNÍ BIOLOGICKÉ NEBEZPEČÍ.** Přečtěte si bezpečnostní informace o biologickém nebezpečí na stránce daného výrobku na adrese **termofisher.com**. Používejte vhodné ochranné brýle, oděv a rukavice. |

**Informace o výrobku**

**Popis výrobku**

Katarální horečka ovcí je nekontagiózní infekční onemocnění ovcí přenášené hmyzem, které je zařazeno do seznamu Mezinárodního úřadu pro nákazy zvířat. Je způsobena infekcí virem katarální horečky ovcí (BTV, Bluetongue virus), který patří do čeledi Reoviridae, rodu *Orbivirus*. Doposud bylo identifikováno 27 různých sérotypů viru BTV.

BTV je v podstatě **považován za nebezpečný pro ovce**: vede k závažné morbiditě a vysoké mortalitě. Virus infikuje také **skot, kozy a jiné volně žijící přežvýkavce.** ale jen zřídka vede ke klinickým projevům u těchto druhů (Lefèvre a Desoutter, 1998).

Virus je téměř vždy přenášen infikovanými tiplíky, tj. malým krevsajícím dvoukřídlým hmyzem rodu *Culicoides, z* čeledi Ceratopogonidae. Rod *Culicoides* zahrnuje více než 1400 druhů, ne všechny jsou však schopny virus přenášet. *Culicoides* se stává infekčním po nasátí krve od infikovaného zvířete, potí se virus rozmnožuje, dokud není dosaženo dostatečného titru, který umožní přenos na jiná vnímavá zvířata.

**Souprava Applied Biosystems ™ VetMAX ™ BTV NS3 All Genotypes** je molekulárně diagnostický nástroj pro stanovení BTV. Slouží ke specifické detekci 27 genotypů BTV s použitím real-time PCR v kombinaci s reverzní transkripcí. Neumožňuje však detekci viru EHDV (virus epizootické hemoragické nemoci), který je příbuzný viru BTV.

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

Tato souprava může být použita na virovou RNA extrahovanou z plné **krve** (v EDTA zkumavkách), ze **sleziny** nebo z orgánů **abortovaných zvířat**.

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

**Obsah soupravy a skladování**

**Souprava VetMAX™ BTV NS3 All Genotypes** obsahuje složky, které lze použít pro detekci BTV a také IPC. Po obdržení by měla být souprava uchovávána neotevřená při teplotě **-30° C až -10° C**. Po prvním použití se řiďte doporučeními pro uchovávání jednotlivých složek 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 reverzní primer, a dále sondu TaqMan® označenou symbolem **FAM**™ - **NFQ** (NFQ = nefluorescenční zhášeč).
* Detekční systém pro IPC: přední (forward) a rezervní primery, a sonda TaqMan® sonda označená symbolem **VIC**™ - **TAMRA**™.
* Pufr, reverzní transkriptáza a PCR enzym.
 | 2 x 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 Používá **již extrahovanou** nukleovou kyselinu pro amplifikaci během RT-PCR. | 2 x 90 μl | -30°C až -10°C | -30°C až -10°C |

**POZNÁMKA**: Doporučujeme uchovávat 3 - Mix BTVNS3 v alikvotních objemech (minimální objem 50 pl), aby se zabránilo více než 3 cyklům zmrazení a rozmrazení.

**Extrakční a amplifikační kontroly**

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

**4a - EPC BTVNS3: positive control for BTV (4a - EPC BTVNS3: pozitivní kontrola pro BTV)**

**Již extrahovaná** pozitivní kontrola pro amplifikaci během RT-PCR v reálném čase.

Pozitivní výsledek v rámci specifikovaného rozsahu Ct se používá k validaci amplifikace cílové struktury BTV pomocí PCR v reálném čase.

Ověření extrakce nukleové kyseliny pro každý vzorek se provádí detekcí endogenní **IPC** (Interní pozitivní kontroly) přítomné **v každém vzorku**.

Pozitivní výsledek IPC pro daný vzorek validuje extrakci vzorku, zda je vzorek pozitivní nebo negativní pro zkoumaný patogen, čímž se eliminují falešně negativní výsledky v důsledku inhibice PCR.

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

**NCS: negative extraction control** **(NCS: negativní extrakční kontrola)**

Tato kontrola obsahuje vodu bez DNázy/RNázy nebo vzorek, o němž je známo, že neobsahuje cílový patogen, který prochází stejným ošetřením (nukleová kyselina a RT-PCR v reálném čase) jako vzorky.

Negativní výsledek BTV a IPC slouží k potvrzení správného zpracování extrakce a k absenci kontaminace během extrakce a RT-PCR v reálném čase.

**NC: negative amplification control** **(Negativní amplifikační kontrola)**

Tato kontrola sestává z 20 μl mixu real-time RT-PCR a 5 μl vody bez DNázy/RNázy, která se používá v RT-PCR v reálném čase.

Negativní výsledek pro všechny cíle (BTV a IPC) potvrzuje absenci kontaminace během přípravy RT-PCR reakce.

**Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky**

Pokud není uvedeno jinak, jsou všechny materiály k dispozici na stránce **thermofisher.com**.

* **Nastavitelné mikropipety** (rozmezí od 1 μl do 1 000 μl) s **filtrovanými** špičkamibez DNázy/RNázy.
* DNase/RNase-free water (Voda bez DNázy/RNázy)
* 1X TE pufr
* 1X PBS pufr
* **Ohřívací blok** schopny dosáhnout teploty **95 °C**
* **PCR termocykler** schopný detekovat následující fluorofory:
* **FAM**™ (maximální emise: λ515 nm)
* **VIC**™ (maximální emise: λ554 nm)
* Spotřební materiál potřebné optické kvality kompatibilní s termocyklerem:
* 96-jamkové PCR stripy, PCR stripy (8 nebo 12 jamek), mikrozkumavky nebo kapiláry
* Vhodné kryty destiček nebo víčka pro zakrytí

**Postup analýzy**

Reakční objem RT-PCR je 25 μl:

* **3 - Mix BTVNS3**: 20 μl na reakci.
* **Extrahovaná RNA**: 5 μl na reakci. **Extrahované vzorky RNA musí být před analýzou denaturovány**.

Během denaturačního kroku použijte 10% nadbytek extrahované RNA potřebné pro všechny reakce, aby se zajistilo, že po denaturaci bude přítomno dostatečné množství RNA.

**Extrakce virové RNA**

RNA musí být extrahována ze vzorků před RT-PCR analýzou v reálném čase.

**POZNÁMKA**: Pro informace o metodách extrakce, které jsou kompatibilní se soupravou VetMAX™ BTV NS3 All Genotypes a které jsou pro ni validovány, kontaktujte technickou podporu.

**Příprava reakcí RT-PCR v reálném čase**

**Distribuce mixu real-time PCR**

1. Vytvořte plán analýzy pro distribuci mixů a vzorků. Je-li to možné, uchovávejte EPC odděleně od jiných vzorků.
2. Rozmrazte „**3 - Mix BTVNS3“** při teplotě **2 °C až + 8 °C** na ledě nebo ve stojanu v chladničce.
3. Promíchejte opatrně „**3 - Mix BTVNS3“** a poté krátce centrifugujte.
4. Přidejte 20 μl mixu „**3 - Mix BTVNS3“** do každé jamky PCR destičky, PCR stripu nebo kapiláry. Uchovávejte vzorky až do distribuce při teplotě **+ 2 °C až +8** °C.

**Denaturace vzorku RNA**

1. Přidejte RNA, která má být denaturována, do jamek PCR destičky nebo stripu. Nechte o něco větší objem v horní části jamek.
2. Uzavřete každou jamku, která obsahuje RNA.
3. Zahřívejte po dobu 3 minut při **+ 92 °C až + 98 °C** v termocykleru nebo v ohřívacím bloku.
4. Denaturovanou RNA uchovávejte při teplotě **+ 2 °C až + 8 °C** na drceném ledu nebo v chlazeném stojanu až do distribuce.

**Distribuce vzorků**

1. Přidejte RNA ze vzorků a kontrol do roztoku mixu pro RT-PCR v reálném čase podle následujícího předem nastaveného plánu analýzy:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Typ analýzy** | **Složka** | **Objem vzorku** |
| Vzorek pro analýzu | RNA extrahovaná ze vzorku a denaturovaná | 5 μl |
| Positive amplification control (Pozitivní amplifikační kontrola) | Denatured 4a - EPC BTVNS3 (Denaturovaný 4a - EPC BTVNS3) | 5 μl |
| Negative extraction control (Negativní extrakční kontrola) (NCS) | Extracted and denatured NCS (Extrahovaný a denaturovaný 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 RT-PCR v reálném čase**

1. Na termocykleru nastavte následující detektory:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Reportér** | **Quencher** |
| BTV | FAM™ | NFQ (nefluorescenční zhášeč) |
| IPC BTV | VIC™ | TAMRA™(1) |
| Pasivní reference: ROX™(1) |

(1) Fluorofory TAMRA™ a ROX™ musí být zadány pro analýzu RT-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 BTV a IPC BTV detektory pro každou jamku používanou v analýze.
2. Pro analýzu nastavte následující program RT-PCR v reálném čase:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Opakování kroků** | **Teplota** | **Doba trvání** |
| Krok 1 | 1x | 45 °C | 10 minut (10'00") |
| Krok 2 | 1x | 95 °C | 10 minut (10'00") |
| Krok 3 | 40x | 95 °C | 15 sekund (00'15") |
| 60 °C(1) | 45 sekund (00'45") |

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

1. Vložte PCR destičku, PCR stripy nebo kapiláry do termocykleru a spusťte RT-PCR.

**Interpretace výsledků**

**Analýza surových dat**

Pro analýzu surových dat si přečtěte doporučení výrobce termocykléru.

1. Nastavte prahové linie zvlášť pro každý cíl.
2. Výsledky interpretujte na základě hodnot Ct vzorků pro každý detektor podle následujících doporučení.

**Validace**

Test je validován, pokud jsou splněna následující kritéria:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **„BTV“ detektor** | **„IPC BTV“ detektor** | **Validace** |
| EPC BTVNS3 | Ct = Ct QC BTV "4a - EPC BTVNS3" ±3 Ct(1) | Ct < 40 nebo Ct > 40(2) | Validováno pro PCR |
| NCS | Ct > 40 | Ct > 40 | Validováno pro extrakci |
| NC | Ct > 40 | Ct > 40 | Validováno pro PCR reagencie |

(1) Viz hodnoty uvedené v oddílu 2.1 „EPC“, certifikátu o analýze šarže použité pro daný test.

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

**Interpretace výsledků**

Pro každý analyzovaný vzorek by měly být výsledky interpretovány takto:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **„BTV“ detektor** | **„IPC BTV“ detektor** | **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.

**Postup pro zacházení s nevalidovanými vzorky**

1. Nařeďte RNA v poměru 1:10 v 1X TE pufru.
2. Denaturujte zředěnou RNA po dobu 3 minut při teplotě **+ 92 °C až + 98 °C**.
3. Proveďte RT-PCR analýzu na 5 μl denaturovaného vzorku.
4. Pokud je zředěná RNA pozitivní na BTV nebo negativní na BTV s přijatelným výsledkem IPC, získaný výsledek se validuje.
5. Pokud je zředěná RNA negativní na BTV s nepřijatelným výsledkem IPC, pak získaný výsledek stále není validován. V takovém případě opakujte extrakci nukleové kyseliny za použití vzorku zředěného 1:10 v 1X PBS pufru.

**Příloha A - Další požadavky platné ve Francii**

**Výrobek registrovaný u francouzské národní referenční laboratoře - Anses Maisons-Alfort, pro použití ve Francii. Platí tyto specifické požadavky:**

**Extrakční a amplifikační kontroly**

V rámci akreditace COFRAC v souladu s normou NF U47-600-1 se doporučuje použít interní referenční materiál, označovaný též jako „sentinelový“, v každé extrakční sérii pro validaci extrakce, purifikace a amplifikační kroky. Tento sentinel musí být připraven tak, jak je popsáno v příloze B standardu NF U47-600-1 a má být zpracován jako vzorek.

**Interpretace výsledků**

Francouzská národní referenční laboratoř vyžaduje opakované testování všech vzorků vykazujících IPC s hodnotou Ct > 35 (viz „Postup pro zacházení s nevalidovanými vzorky“).

**Dokumentace a podpora**

**Zákaznická a technická podpora**

Technická podpora: navštivte **thermofisher.com/askaquestion**

Navštivte **thermofisher.com/support** pro nejnovější služby a podporu:

* Mezinárodní kontaktní telefonní čísla
* Objednávková a webová podpora
* Uživatelské příručky, manuály a protokoly
* Osvědčení o analýze
* Bezpečnostní listy (BL; známé také jako MSDS)

**POZNÁMKA**: Pokud chcete získat bezpečnostní listy pro chemické látky jiných výrobců, kontaktujte výrobce.