Souprava VetMAX™ Schmallenberg Virus

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

**Katalogové číslo** SBVS50

**Pub. č.** MAN0008328 **Rev**. B.0

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Technologie** | **Druhy** | **Nukleová kyselina izolovaná z matric** | **Typ testu** |
| Real-time RT-PCR (RNA) | Skot | Mozková tkáň |  |
| * Duplexní
 | Malí přežvýkavci | Krev (EDTA zkumavky) | Individuální |
| * Endogenní IPC
 | (ovce, kozy) | Sérum |  |

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\uzivatel\AppData\Local\Temp\FineReader11.00\media\image2.jpeg | **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\image3.jpeg | **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**

**Souprava VetMAX™ Schmallenberg** od firmy **Applied Biosystems™** je molekulárně diagnostický nástroj pro stanovení SBV. Slouží ke specifické detekci genu S viru SBV pomocí real-time PCR 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 extrakci, tak i nepřítomnost inhibitorů PCR ve vzorku.

Soupravu lze použít k detekci virové RNA extrahované 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 extrahovanou z mozkové tkáně.

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

**Obsah soupravy a skladování**

**Souprava VetMAX ™ Schmallenberg Virus** 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 reverzní primer, a dále sondu TaqMan® označenou symbolem **FAM**™ - **NFQ** (NFQ = nefluorescenční zhášeč).
* Detekční systém pro IPC: přední (forward) a reverzní primery a sondu TaqMan® označenou symbolem **VIC**™ - **TAMRA**™.
* Pufr, reverzní transkriptáza a PCR enzym.
 | 2 x 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 extrahované** nukleové kyseliny, která má být amplifikována během PCR v reálném čase. | 90 μl | -30°C až -10°C | -30°C až -10°C |

**Extrakční a amplifikační kontroly**

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

**4a - EPC SBVS: positive control for SBV (pozitivní kontrola pro SBV)**

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

Pozitivní výsledek v rámci specifikovaného rozsahu Ct umožňuje ověřit amplifikaci cílové struktury SBV 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, 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 extrakční kontrola)**

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

Negativní výsledek pro SBV a IPC umožňuje validovat nepřítomnost kontaminace během extrakce a RT-PCR v reálném čase.

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

Jedná se o amplifikační mix, který 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 SBV a 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**.

* Vysoce přesné mikropipety (rozmezí od 1 μl do 1000 μl) s filtrovanými špičkamibez 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: 96-jamkové 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
* **Extrahovaná RNA**: 5 μl na analýzu

**Extrakce virové RNA**

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

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

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

1. Vytvořte plán analýzy pro distribuci mixů 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 **3 - Mix SBVS** a poté krátce centrifugujte.
4. Přidejte **20 μl mixu 3 - Mix SBVS** do každé jamky PCR destičky, PCR stripu nebo kapiláry.
5. Přidejte RNA ze vzorků a kontrol do reakčního mixu podle následujícího předem nastaveného plánu analýzy:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Typ analýzy** | **Složka** | **Objem vzorku** |
| Vzorek pro analýzu | RNA extrahovaná ze vzorku | 5 μl |
| Positive amplification control (Pozitivní amplifikační kontrola) | **4a - EPC SBVS** | 5 μl |
| Negative extraction control (Negativní extrakční kontrola) (NCS) | Extrahovaná 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** | **Quencher** |
| SBV | FAM™ | NFQ (nefluorescenční zhášeč) |
| IPC SBV | VIC™ | TAMRA™(1) |
| Pasivní reference: ROX™(1) |

(1) Fluorofory TAMRA™ a 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:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Opakování kroků** | **Teplota** | **Doba trvání** |
| Krok 1 | x1 | 45 °C | 10 minut |
| Krok 2 | x1 | 95 °C | 10 minut |
| Krok 3 | x45 | 95 °C | 15 sekund |
| 60 °C(1) | 45 sekund |

(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 v reálném čase.

**Analýza výsledků**

**Analýza surových dat**

Pro analýzu surových dat postupujte podle doporučení výrobce termocykléru.

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 of **4a - EPC SBVS** ± 3Ct(1) | Ct < 45 nebo Ct > 45(2) | Validováno pro PCR |
| NCS | Ct > 45 | Ct > 45 | Validováno pro extrakci |
| NC | Ct > 45 | Ct > 45 | Validované PCR složky |

(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 testu.

**Interpretace výsledků**

Pro každý analyzovaný vzorek by měly být výsledky interpretovány takto:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **SBV detektor** | **Detektor IPC SBV** | **Interpretace** |
| Ct < 45 | Ct < 45 nebo Ct > 45 | SBV detekován |
| Ct > 45 | Ct < 45 | SBV nedetekován |
| Ct > 45 | Ct > 45 | 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 na 5 μl tohoto ředění.
3. Pokud je zředěná RNA pozitivní na SBV nebo negativní na SBV s přijatelným výsledkem IPC, získaný výsledek se validuje.
4. Pokud je zředěná RNA negativní na SBV s nepřijatelným výsledkem IPC, pak získaný výsledek stále není validován. V takovém případě opakujte extrakci nukleové kyseliny za použití vzorku zředěného 1:2 v 1X PBS pufru.

**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.

.