

virotype[®] BTV pan/4 RT-PCR Kit РЪКОВОДСТВО

За откриване на РНК от *Bluetongue Virus*
(BTV) и BTV серотип 4

Лицензиран съгласно § 11 (2) на немския Закон за здравето на животните (German Animal Health Act) MA №: FLI-C 020



24 реакции (кат. № VT280453)



96 реакции (кат. № VT280455)



INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Deutscher Platz 5b,
04103 Leipzig, Германия

Съдържание

Съдържание на набора	3
Предназначение.....	3
Символи.....	4
Контрол на качеството	4
Съхранение	5
Информация за безопасност	5
Въведение	6
Принцип	6
Екстракция на РНК.....	7
Оборудване и реактиви, които трябва да бъдат доставени от потребителя.....	9
Важни забележки	10
Общи предпазни мерки	10
Протокол: RT-PCR анализ в реално време за откриване на РНК от <i>Bluetongue Virus</i> и BTV-4	12
Важни забележки преди започване.....	12
Какво трябва да направите, преди да започнете	12
Процедура при използване на термоциклер за анализ в реално време с плака с 96 ямки	13
Процедура, когато се използва Rotor-Gene® Q или подобни термоциклери	16
Анализ на данните и интерпретиране	19
Интерпретиране на резултатите	19
Промяна на индекс	23

Съдържание на набора

virotype BTV pan/4 RT-PCR Kit	(24)	(96)
Кат. №	VT280453	VT280455
Брой реакции	24	96
Master Mix (Главна смес) (епруветка с оранжева капачка) включва ензими, инициатори и сонди	1 x 500 µl	2 x 980 µl
Positive Control (Положителна контрола) (епруветка с червена капачка)	1 x 25 µl	1 x 150 µl
Negative Control (Отрицателна контрола) (епруветка със синя капачка)	1 x 25 µl	1 x 150 µl
Ръководство	1	1

Предназначение

virotype BTV pan/4 RT-PCR Kit е предназначен за откриване на РНК на *Bluetongue Virus* в цяла кръв от преживни животни (индивидуални или сборни проби) и тъканни проби (далак, лимфни възли) от говеда, овце и кози.

Наборът е одобрен от Friedrich-Loeffler-Institut и е лицензиран в съответствие с § 11 (2) на немския Закон за здравето на животните (FLI-C 020) за употреба в Германия за ветеринарни диагностични процедури.

Само за ветеринарномедицинска употреба.

СИМВОЛИ



Законен производител



Партиден номер



Годно до



Температурни ограничения за съхранение



Ръководство



Каталожен номер



Номер на материала



Да се пази от светлина



За проби от говеда, овце и кози

Контрол на качеството

В съответствие с ISO-сертифицираната система за управление на качеството на INDICAL всяка партида на virotype BTV pan/4 RT-PCR Kit е тествана за предварително определени спецификации, за да се гарантира постоянно качество на продукта.

Съхранение

Компонентите на набора virotype BTV pan/4 RT-PCR Kit трябва да се съхраняват при температури от -30°C до -15°C и са трайни до датата на изтичане на срока на годност, отбелязана на етикета. Избягвайте повторно размразяване и замразяване (>2x), тъй като това може да намали чувствителността на анализа. Замразявайте компонентите в аликвоти само ако ще се използват периодично.

Информация за безопасност

При работа с химикали винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация вижте съответните информационни листовки за безопасност (ИЛБ). Те са на разположение при местния търговски представител или можете да ги получите при поискване по имейл на адрес **compliance@indical.com**.

Всички остатъци от проби и предметите, които са били в контакт с пробите, трябва да се обеззаразят или изхвърлят като потенциално инфекциозен материал.

Въведение

Син език е инфекциозно, незаразно заболяване при преживните животни. Агентът е *Bluetongue Virus* (BTV) – вирус с двуверижна РНК от рода *Orbivirus* от семейството *Reoviridae*, който включва най-малко 27 известни серотипа. BTV е силно разпространен по света. От заболяването основно биват засегнати овце, говеда и кози. Обикновено ясни клинични признаци се наблюдават само при овцете. В някои случаи езикът може да показва интензивна хиперемия и става цианотичен (Син език).

BTV серотип 4 е с епидемиологично значение в Европа и е причина за неотдавнашни огнища на болестта син език. Вирусът се предава от някои мушици от рода *Culicoides*. Освен това вирусът може да се разпространява чрез замърсени игли и хирургично оборудване.

Принцип

Полимеразната верижна реакция (Polymerase Chain Reaction, PCR) се основава на амплификацията на специфични области на генома на патогена. При RT-PCR анализа в реално време амплифицираният продукт се открива, като се използват флуоресцентни багила. Те обикновено са свързани към олигонуклеотидни сонди, които се свързват изключително с амплифицирания продукт. Проследяването на интензитета на флуоресценция по време на PCR анализ (напр. в реално време) позволява откриването на акумулирания продукт без необходимост от повторно отваряне на реакционните епруветки след това.

Наборът virotype BTV pan/4 RT-PCR Kit съдържа всички необходими реактиви за откриване на РНК на BTV, включително Positive и Negative Control. С този набор в една реакционна епруветка се изпълняват и обратна транскрипция, и PCR, като така се намалява рискът от замърсяване. Наборът virotype BTV pan/4 RT-PCR Kit използва три специфични комбинации инициатор/сонда:

- Флуоресцентно багрило FAM™ за РНК на най-малко 27 известни серотипа BTV
- Флуоресцентно багрило Cy[®]5 за РНК на серотип 4 (BTV-4)
- Флуоресцентно багрило HEX™ за вътрешната контрола (в пробата има β-актин и РНК)

Positive Control съдържа *in vitro* РНК на BTV-4, в която е внедрено флуоресцентно багрило Cy5 и BTV-8 с двуверижна РНК, в която е внедрено флуоресцентно багрило FAM. Откриването на флуоресцентно багрило FAM позволява контрол на стъпката на денатуриране, тъй като успешното денатуриране на вирусната двойноверижна РНК е условие за амплификация.

Екстракция на РНК

virotype BTV pan/4 може да се използва за откриване на РНК на BTV в проби на цяла кръв от преживни животни (за предпочитане с антикоагуланти, напр. EDTA кръв) и тъканни проби (далак, лимфни възли).

Поради високата чувствителност на теста могат да се анализират сборни групи от до 10 индивидуални кръвни проби. Но оптималният размер на сборната група зависи от регионалното разпространение на BTV.

Преди RT-PCR анализа в реално време вирусната РНК трябва да бъде извлечена от началния материал. INDICAL предлага разнообразни валидирани набори за екстракция на РНК от проби с животински произход.

Екстракция на база магнитни зърна:

- MagAttract® 96 cador® Pathogen Kit

Екстракция на база центрофугиращи колони:

- QIAamp® cador® Pathogen Mini Kit
- cador Pathogen 96 QIAcube® HT Kit

Ако RT-PCR анализът в реално време не се изпълни непосредствено след екстракцията, съхранете РНК при температура -20°C или при -70°C за по-дълъг период на съхранение.

За допълнителна информация относно автоматизираната и ръчната екстракция на РНК на BTV от различни типове проби вижте съответното ръководство или се свържете с отдела по поддръжка на INDICAL и **support@indical.com**.

Оборудване и реактиви, които трябва да бъдат доставени от потребителя

При работа с химикали винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (ИЛБ), които може да получите от доставчика на продукта.

- Пипети
- Накрайници за пипети без нуклеазна активност, устойчиви на аерозоли, с филтри
- Стерилни 1,5 ml епруветки Eppendorf®
- Консумативи без нуклеазна активност (без РН-ази/ДН-ази). За да се избегне замърсяване с нуклеаза на всички реактиви и консумативи, използвани за подготвяне на PCR анализ за определяне на чувствителността на вирусни нуклеинови киселини, трябва да се вземат специални предпазни мерки
- Охлаждащо устройство или лед
- Настолна центрофуга с ротор за 1,5 ml епруветки
- Термоциклер за анализ в реално време с подходящи флуоресцентни канали
- Подходящ софтуер за избрания термоциклер за анализ в реално време
- Подходящи стрип епруветки и стрип капачки или оптична 96-ямкова микроплака с оптичен запечатващ филм или капак за избрания термоциклер за анализ в реално време

Важни забележки

Общи предпазни мерки

Потребителят трябва винаги да отделя особено внимание на следното:

- Използвайте крайници за пипети без нуклеазна активност с филтри.
- Съхранете и извлекете положителните материали (образци, положителни контроли и ампликони) отделно от всички други реактиви и ги добавете към реакционната смес в пространствено отделено съоръжение.
- Размразете всички компоненти върху лед, преди да започнете анализ.
- Когато се размразят, смесете компонентите, като ги обърнете и центрофугирате за кратко.
- Не използвайте компонентите на тест-набора след датата на изтичане на срока на годност.
- Съхранявайте пробите и контролите върху лед или в охлаждащ блок по време на подготовка на реакциите.

Отрицателна контрола

Поне една реакция с отрицателната контрола трябва да бъде включена във всеки цикъл на PCR анализ. Това позволява оценка на замърсяването в реакцията.

Положителна контрола

Когато се изпълнява PCR анализ върху неизвестни проби, се препоръчва да се изпълни реакция с положителна контрола в

цикъла на PCR анализ, съдържаща проба, за която е известно, че съдържа целевата вирусна РНК. Положителната контрола служи за доказване на функционалността на анализа на патогените, например правилната подготовка на реакционната смес. Използвайте 5 µl от предоставения с набора virotype BTV pan/4 RT-PCR Kit реактив Positive Control, за да тествате успешната амплификация на мишената.

Контрол на екстракцията и амплификацията

За повишена безопасност и удобство на процеса е включен анализ за контрол на екстракцията и амплификацията под формата на допълнителен набор инициатор/проба, който открива присъстващ генетичен ген в пробата. Това позволява проследяването на екстракцията и амплификацията.

Протокол: RT-PCR анализ в реално време за откриване на РНК от *Bluetongue Virus* и BTV-4

Важни забележки преди започване

- Моля, преди да започнете, прочетете „Важни забележки“ на страница 10.
- Включете поне една положителна контрола (Positive Control) и една отрицателна контрола (Negative Control) във всеки цикъл на PCR анализ.
- Преди да започнете процедурата, прочетете старателно протокола и се запознайте с работата на избрания термоциклер за PCR анализ в реално време.
- РНК е нестабилна. Изпълнете протокола без прекъсване.

Какво трябва да направите, преди да започнете

- Размразете всички реактиви върху лед и ги предпазвайте от светлина.
- Дръжте реактивите върху лед по време на подготовката на PCR анализа.
- Преди да използвате реактивите, центрофугирайте ги за кратко.

Процедура при използване на термоциклер за анализ в реално време с плака с 96 ямки

1. Пипетирайте 5 µl проби на РНК, Positive Control и Negative Control в отделни реакционни епруветки. Затворете реакционните епруветки (напр. с PCR запечатващо фолио).
Включете реакции на положителна и отрицателна контрола.
Положителна контрола: Използвайте 5 µl положителна контрола (Positive Control) вместо проба на РНК.
Отрицателна контрола: Използвайте 5 µl отрицателна контрола (Negative Control) вместо проба на РНК
2. Денатурирайте пробите за 5 минути при 98°C в стандартен термоциклер с 96-ямкова плака с нагриващ се капак.
3. Веднага охладете върху ледена вода или течен азот за най-малко 20 секунди. След това съхранете върху лед или в охлаждащо устройство.
4. Пипетирайте 20 µl от Master Mix във всяка реакционна епруветка. Така крайният обем на един тест е 25 µl (Таблица 1).

Таблица 1. Подготовка на реакционна смес

Компонент	Обем
Master Mix	20 µl
Проба	5 µl
Общ обем	25 µl

5. Затворете реакционните епруветки със съответстващите капачки.
6. Задайте филтрите за репортерните багрила в софтуера на Вашия термоциклер в съответствие с Таблица 2.

Таблица 2. Настройки на филтъра за репортерната система

Патоген/Вътрешна контрола	Репортерна система
BTV pan	FAM
BTV-4	Cy5
Вътрешна контрола	HEX/ JOE™ ¹
Пасивен еталон ²	ROX™

1 Използвайте опцията, подходяща за Вашия термоциклер.

2 Вътрешен еталон за използване със система за откриване на секвенции ABI PRISM® чрез Applied Biosystems®

7. Изпълнете един цикъл по протокола за RT-PCR анализ в реално време в съответствие с Таблица 3, ако се обработва само virotype BTV pan/4 RT-PCR Kit или само в комбинация с virotype BTV pan/8 RT-PCR Kit.

Таблица 3. Протокол за RT-PCR анализ в реално време за BTV pan/4 и виротип BTV pan/8

Стъпка	Температура	Продължителнос т	Брой цикли
Обратна транскрипция	50°C	10 мин.	1
Първоначална активация	95°C	10 мин.	1
2-стъпкова обработка в термоциклер			
Денатуриран е	95°C	15 сек.	40
Ренатуриран е/Удължаван е*	60°C	60 сек.	

* Събиране на данни за флуоресценцията.

8. Изпълнете протокола за RT-PCR анализ в реално време в съответствие с Таблица 4, ако се обработват едновременно анализи за други виротипове (напр. виротип BVDV и/или виротип SBV).

Таблица 4. Протокол за RT-PCR анализ в реално време за едновременни анализи

Стъпка	Температура	Продължително	Брой
	а	ст	цикли
Обратна транскрипция	50°C	20 мин.	1
Първоначална активация	95°C	15 мин.	1
3-стъпкова обработка в термоциклер			
Денатуриране	95°C	30 сек.	
Ренатуриране*	57°C	45 сек.	40
Удължаване	68°C	45 сек.	

* Събиране на данни за флуоресценцията.

Процедура, когато се използва Rotor-Gene® Q или подобни термоциклери

1. Пипетирайте поне 7 µl от проби на РНК или Positive Control в отделни 0,2 ml PCR реакционни епруветки. Затворете реакционните епруветки (напр. с PCR запечатващо фолио).
Включете реакции на положителна контрола.
Положителна контрола: Използвайте поне 7 µl положителна контрола (Positive Control) вместо проба на РНК.
2. Денатурирайте пробите за 5 минути при 98°C в стандартен термоциклер с 96-ямкова плака с нагриващ се капак.
3. Веднага охладете върху ледена вода или течен азот за най-малко 20 секунди. След това съхранете върху лед или охлаждащо устройство.
4. Пипетирайте 5 µl проба на РНК, Positive Control и Negative Control в отделни стрип епруветки (0,1 ml), които са подходящи за Rotor-Gene Q или избрания термоциклер.
5. Добавете 20 µl от Master Mix във всяка реакционна епруветка. Така крайният обем на един тест е 25 µl (Таблица 5).

Таблица 5. Подготовка на реакционна смес

Компонент	Обем
Master Mix	20 µl
Проба	5 µl
Общ обем	25 µl

6. Затворете реакционните епруветки със съответстващите капачки.
7. Задайте филтрите за репортерните багрила в софтуера на Вашия термоциклер в съответствие с Таблица 6.

Таблица 6. Настройки на филтъра за репортерната система при използване на Rotor-Gene Q

Патоген/Вътрешна контрола	Репортерна система
BTV	зелен/FAM
BTV-8	червен/Cy5
Вътрешна контрола	жълт/HEX

8. Изпълнете един цикъл по протокола за RT-PCR анализ в реално време в съответствие с Таблица 7, ако се обработва само virotype BTV pan/4 RT-PCR Kit или само в комбинация с virotype BTV pan/8 RT-PCR Kit.

Таблица 7. Протокол за RT-PCR анализ в реално време за BTV pan/4 и виротип BTV pan/8

Стъпка	Температура	Продължителнос т	Брой цикли
Обратна транскрипция	50°C	10 мин.	1
Първоначална активация	95°C	10 мин.	1
2-стъпкова обработка в термоциклер			
Денатуриране	95°C	15 сек.	40
Ренатуриране/ Удължаване*	60°C	60 сек.	

* Събиране на данни за флуоресценцията.

9. Изпълнете протокола за RT-PCR анализ в реално време в съответствие с Таблица 8, ако се обработват едновременно анализи за други виротипове (напр. виротип BVDV и/или виротип SBV).

Таблица 8. Протокол за RT-PCR анализ в реално време за едновременни анализи

Стъпка	Температура	Продължително ст	Брой цикли
Обратна транскрипция	50°C	20 мин.	1
Първоначална активация	95°C	15 мин.	1
3-стъпкова обработка в термоциклер			
Денатуриране	95°C	30 сек.	
Ренатуриране*	57°C	45 сек.	40
Удължаване	68°C	45 сек.	

* Събиране на данни за флуоресценцията.

Анализ на данните и интерпретиране

Интерпретиране на резултатите

За да бъде валиден анализът, Positive Control трябва да даде сигнал в каналите на FAM, Cy5 и HEX със $C_t^1 < 35$. Ако няма сигнал или ако $C_t \geq 35$ в канала на FAM за измерване на Positive Control, стъпките за денатуриране и охлаждане са недостатъчни и тестването трябва да се повтори. Negative Control не трябва да дава сигнал.

Следващите резултати са възможни, ако се работи с неизвестни проби. Възможните резултати за пробите са обобщени също в Таблица 9 на стр. 21.

Пробата е положителна за BTV и BTV-4 и анализът е валиден, ако са изпълнени следните критерии:

- Пробата показва сигнал в каналите на FAM, Cy5 и HEX.
- Positive Control показва сигнал във всички канали.
- Negative Control не показва сигнал в никой от каналите.

Обърнете внимание, че високите концентрации на РНК на BTV в пробата могат да доведат до понижен сигнал за HEX или липса на сигнал за HEX поради конкуренция с вътрешната контрола.

Пробата е положителна за BTV и отрицателна за BTV-4 и анализът е валиден, ако са изпълнени следните критерии:

- Пробата показва сигнал в каналите на FAM и HEX, но няма сигнал в канала на Cy5.
- Positive Control показва сигнал във всички канали.

¹Прагов цикъл (C_t) – цикъл, при който диаграмата на амплификацията пресича прага, т.е. има първо ясно отчетено увеличение във флуоресценцията

- Negative Control не показва сигнал в никой от каналите.

Обърнете внимание, че високите концентрации на РНК на BTV в пробата могат да доведат до понижен сигнал за HEX или липса на сигнал за HEX поради конкуренция с вътрешната контрола.

Пробата е отрицателна за BTV и BTV-4 и анализът е валиден, ако са изпълнени следните критерии:

- Пробата показва сигнал само в канала на HEX.
- Positive Control показва сигнал във всички канали.
- Negative Control не показва сигнал в никой от каналите.

Положителен сигнал за HEX изключва възможността за PCR инхибиране и/или некоректна екстракция на РНК, тъй като вътрешната контрола е амплифицирана.

Резултатите от пробите са неопределени и анализът е невалиден, ако възникне следното:

- Пробата не показва сигнал в никой от каналите на флуоресценция.

PCR е инхибирана или екстракцията от пробата е некоректна. Препоръчва се повторно тестване на съответните отделни проби във вода с липса на нуклеазна реакция (напр. разрежена 1:5), повторна екстракция на РНК или повтаряне на цялата процедура на тестване, като започнете с нов материал от пробата.

Проверете дали има сигнал за флуоресценция във всички канали за реакция на положителна контрола (Positive Control). Липсата на сигнал за Positive Control сочи за наличие на грешка, която би могло да се дължи на неправилно денатуриране на РНК, неуспешна екстракция на РНК или неправилни условия на обработка в термоциклера.

Повторете екстракцията на РНК или повторете цялата процедура, като започнете с нов материал от пробата.

Таблица 9. Таблица за интерпретиране на резултатите*

FAM	Cy5	HEX	Резултат за пробата
			Положителна за:
X		(X)	BTV
X	X	(X)	BTV <u>и</u> BTV-4
		X	отрицателна
			неопределен

* Интерпретация на резултатите за пробите може да бъде определена, при условие че са изпълнени реакции на положителна и отрицателна контрола. Positive Control трябва да даде сигнал в каналите на FAM, Cy5 и HEX. Negative Control не трябва да дава сигнал. За пълно описание на възможни резултати за проби вижте „Анализ на данните и интерпретиране“ на стр. 19.

INDICAL предлага гама от набори за ELISA, както и PCR и RT-PCR набори за установяване на животински патогени в реално време.

Посетете **www.indical.com** за повече информация относно продуктите *bactotype*, *cadog*, *cattletype*, *flocktype*, *pigtype* и *virotype*.

За актуална информация относно лицензирането и заявления за отказ от отговорност за конкретни продукти вижте съответното ръководство или наръчника за потребителя на набора INDICAL.

Ограничено лицензионно споразумение за набора virotype BTV pan/4 RT-PCR Kit

Използването на продукта означава, че закупилите или използващите продукта лица приемат следните условия:

1. Този продукт може да се използва единствено в съответствие с протоколите, предоставени с продукта и настоящото ръководство, както и само с компонентите, включени в набора. INDICAL не предоставя лиценз във връзка с никоя от интелектуалните си собствениности за използване или включване на приложените компоненти в този набор с каквито и да са компоненти, които не са включени в него, с изключение на описаните в протоколите, предоставени с продукта, настоящото ръководство и допълнителните протоколи, които можете да намерите на www.indical.com. Някои от тези допълнителни протоколи са предоставени от потребители на INDICAL за потребители на INDICAL. Тези протоколи не са щателно тествани или оптимизирани от INDICAL. INDICAL нито предоставя гаранция, нито заявява, че те не нарушават правата на трети страни.
2. Освен изрично посочените лицензи INDICAL не дава никаква гаранция, че този набор и/или неговата употреба не нарушават правата на трети страни.
3. Този набор и неговите компоненти са лицензирани за еднократна употреба и не могат да се използват повторно, обновяват или препродават.
4. INDICAL изрично отхвърля всички други лицензи, посочени или подразбиращи се, с изключение на изрично заявените.
5. Купувачът и потребителят на набора дават съгласие да не предприемат или позволяват на други лица да предприемат каквито и да са стъпки, които могат да доведат до или да улеснят някое от действията, забранени по-горе. INDICAL може да приложи забраните в настоящото Ограничено лицензионно споразумение в който и да е съд и ще възстанови всичките си разходи за разследване и съдебни разходи, включително адвокатски хонорари, при всяко действие за прилагане на Ограниченото лицензионно споразумение или някое от правата на интелектуална собственост, свързани с набора и/или неговите компоненти.

За актуалните условия на лиценза вижте www.indical.com.

Търговски марки: bactotype[®], cador[®], cattletype[®], flocktype[®], pigtype[®], virotype[®] (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); MagAttract[®], QIAamp[®], QIAcube[®], Rotor-Gene[®] (QIAGEN GmbH); ABI PRISM[®] 7500 (Applied Biosystems); FAM[™], HEX[™], JOE[™], ROX[™] (Life Technologies Corporation); Cy[®]5 (GE Healthcare); Eppendorf[®] (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH). Лицензирани сонди, произведени от Integrated DNA Technologies, Inc. Регистрираните имена, търговските марки и т.н., използвани в този документ, дори ако не са изрично обозначени като такива, не се считат за незащитени от закона.

HB-2054-EN-002 © 2018 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, всички права запазени.

Промяна на индекс

Ръководство	Информация	Промяна
HB-2054-EN-002	август 2018 г.	Дизайн на INDICAL

INDICAL
BIOSCIENCE

За поръчки: www.indical.com/contact

Техническа поддръжка:

support@indical.com

Уебсайт: www.indical.com