

# virotype<sup>®</sup> BVDV 2.0 RT-PCR Kit

## Instrukcja obsługi

Do wykrywania RNA *wirusa wirusowej biegunki bydła* (Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV)

Produkt licencjonowany zgodnie z §11 (2) niemieckiej ustawy o ochronie zdrowia zwierząt Nr pozwolenia na wprowadzenie do obrotu: FLI-C 112



100 reakcji (nr kat. VT280385)



500 reakcji (nr kat. VT280387)



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

# Spis treści

Zawartość zestawu .....	3
Przeznaczenie .....	3
Symbole .....	4
Kontrola jakości .....	4
Przechowywanie .....	5
Informacje dotyczące bezpieczeństwa .....	5
Wstęp .....	6
Zasada działania .....	7
Izolacja RNA .....	8
Sprzęt i odczynniki zapewniane przez użytkownika .....	11
Ważne informacje .....	12
Ogólne środki bezpieczeństwa .....	12
Protokół: Reakcja RT-PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania RNA wirusa wirusowej biegunki bydła ( <i>Bovine Virus Diarrhea Virus</i> ) ..	14
Ważne informacje przed rozpoczęciem .....	14
Czynności do wykonania przed rozpoczęciem .....	14
Procedura .....	15
Analiza i interpretacja danych .....	17
Interpretacja wyników .....	17
Indeks zmian .....	24

## Zawartość zestawu

<b>virotype BVDV 2.0 RT-PCR Kit</b>	<b>(100)</b>	<b>(500)</b>
<b>Nr kat.</b>	<b>VT280385</b>	<b>VT280387</b>
<b>Liczba reakcji</b>	<b>100</b>	<b>500</b>
Master Mix (Mieszanina Master Mix) (próbówka z pomarańczową zatyczką); zawiera startery, sondy i enzymy	1 x 800 µl	5 x 800 µl
Positive Control (Kontrola pozytywna) (próbówka z czerwoną zatyczką)	1 x 150 µl	2 x 150 µl
Negative Control (Kontrola negatywna) (próbówka z niebieską zatyczką)	1 x 150 µl	2 x 150 µl
Instrukcja obsługi	1	1

## Przeznaczenie

Zestaw virotype BVDV 2.0 RT-PCR Kit jest przeznaczony do wykrywania RNA wirusa wirusowej biegunki bydła (*Bovine Viral Diarrhea Virus*, BVDV) w (odrębnych lub zbiorczych) próbkach krwi, osocza, surowicy, tkanek, mleka i tkanek małżowiny usznej pobranych od bydła.

Zestaw został zatwierdzony przez instytut Friedrich-Loeffler-Institut i jest licencjonowany zgodnie z §11 (2) niemieckiej ustawy o ochronie zdrowia zwierząt (FLI-C 112) do użytku w Niemczech do celów diagnostyki weterynaryjnej.

**Produkt wyłącznie do zastosowań weterynaryjnych.**

# Symbole



Oficjalny producent



Numer serii



Termin ważności



Zakres dopuszczalnych temperatur przechowywania



Instrukcja obsługi



Numer katalogowy



Numer materiału



Chronić przed światłem



Do stosowania z próbkami pobranymi od bydła

## Kontrola jakości

Zgodnie z poświadczonym certyfikatem ISO systemem zarządzania jakością firmy INDICAL każda seria zestawu virotype BVDV 2.0 RT-PCR Kit jest testowana pod kątem wstępnie ustalonych specyfikacji w celu zapewnienia spójnej jakości produktu.

# Przechowywanie

Składniki zestawu virotype BVDV 2.0 RT-PCR Kit należy przechowywać w temperaturze od -30°C do -15°C, w której zachowują stabilność do terminu ważności podanego na etykiecie. Należy unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania (>3x), ponieważ może to doprowadzić do obniżenia czułości oznaczeń. Jeśli składniki będą używane tylko sporadycznie, należy zamrozić je w porcjach.

## Informacje dotyczące bezpieczeństwa

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS). Można je uzyskać od lokalnego przedstawiciela handlowego lub wysyłając zapytanie na adres e-mail **[compliance@indical.com](mailto:compliance@indical.com)**.

Wszystkie pozostałości próbek oraz obiekty, które miały kontakt z próbkami, należy poddać dekontaminacji lub utylizacji jako materiały potencjalnie zakaźne.

# Wstęp

Zestaw virotype BVDV 2.0 RT-PCR Kit to czułe narzędzie przeznaczone do wykrywania RNA wirusa wirusowej biegunki bydła (*Bovine Viral Diarrhea Virus*, BVDV) w próbkach pobranych od bydła.

Wirusowa biegunka bydła i choroba błon śluzowych (Bovine Viral Diarrhea/Mucosal Disease, BVD/MD) to jedna z najważniejszych zakaźnych chorób wirusowych występujących u bydła na całym świecie. Czynnikiem wywołującym tę chorobę jest wirus wirusowej biegunki bydła (*Bovine Viral Diarrhea Virus*, BVDV) z materiałem genetycznym w postaci jednoniciowego RNA, który należy do rodzaju *Pestivirus*. Wyodrębniono dwa gatunki tego wirusa — *Pestivirus A* (BVDV-1) i *Pestivirus B* (BVDV-2). Możliwe jest wyszczególnienie dalszych podtypów. W oparciu o wzrost wirusów w hodowli komórkowej izolaty wirusa BVDV obu gatunków można klasyfikować do dwóch biotypów — cytotatycznego (cp) i niecytotatycznego (ncp).

Zależnie od statusu immunologicznego zwierząt zakażenia wirusem BVDV mogą wywoływać objawy ze strony układu żołądkowo-jelitowego i oddechowego o różnym nasileniu, a także powodować problemy w rozrodzie. Wynikają one z zakażenia płodu drogą przezłożyskową prowadzącego do poronień, wad wrodzonych, a w przypadku zakażenia przed nabyciem immunokompetencji do trwałego zakażenia cieląt (osobniki trwale zakażone (Persistently Infected, PI), inaczej wiremiczne).

Osobniki PI powstają wyłącznie w wyniku zakażenia prenatalnego, natomiast zakażenia pourodzeniowe prowadzą do przejściowej wiremii, indukując produkcję przeciwciał neutralizujących wirusa. Do choroby błon śluzowych dochodzi u zwierząt z trwałą wiremią, będących nosicielami obu biotypów wirusa BVD (BVDV cp i ncp).

Za rozprzestrzenianie się wirusa BVDV odpowiedzialne są niezidentyfikowane osobniki PI, gdyż przez całe swoje życie wydalają one duże ilości cząstek wirusowych. Mogą one zakażać zwierzęta ciężarne, które w następstwie tego mogą urodzić kolejne osobniki PI.

Główną metodą skutecznego zwalczania tej choroby jest wczesna identyfikacja osobników PI.

## Zasada działania

Łańcuchowa reakcja polimerazy (Polymerase Chain Reaction, PCR) opiera się na amplifikacji określonych regionów genomu patogenu. W przypadku reakcji PCR w czasie rzeczywistym namnożony produkt jest wykrywany przy użyciu barwników fluorescencyjnych. Zwykle są one przyłączone do sond oligonukleotydowych, które wiążą się swoiście z namnożonym produktem. Monitorowanie natężenia fluorescencji podczas przebiegu reakcji PCR (tzn. w czasie rzeczywistym) umożliwia wykrycie gromadzącego się produktu bez potrzeby ponownego otwierania próbek po zakończeniu reakcji.

Zestaw virotype BVDV 2.0 RT-PCR Kit zawiera wszystkie odczynniki niezbędne do wykrycia RNA wirusa BVDV, w tym odczynniki Positive Control i Negative Control. Podczas stosowania tego zestawu odwrotna transkrypcja i reakcja PCR zachodzą w jednej próbówce reakcyjnej, co zmniejsza ryzyko zanieczyszczenia.

Zestaw zawiera dwie kontrole wewnętrzne. Kontrola endogenna (Endogenous Control, EC) służy do wykrywania genu  $\beta$ -aktyny obecnego w próbce, a egzogenna kontrola wewnętrzna (Internal Control, IC) dodawana podczas procedury oczyszczania RNA umożliwia sprawdzenie, czy izolacja i amplifikacja przebiegły pomyślnie.

Zastosowanie obu kontroli wewnętrznych wyklucza możliwość otrzymania fałszywie negatywnych wyników

W zestawie wykorzystywane są trzy kombinacje swoistych starterów/sond:

- Barwnik fluorescencyjny FAM™ dla RNA wirusa BVDV
- Barwnik fluorescencyjny HEX™ dla kontroli endogennej (Endogenous Control, EC)
- Barwnik fluorescencyjny Cy®5 dla egzogennej kontroli wewnętrznej (Internal Control, IC)

Odczynnik Positive Control umożliwia weryfikację funkcjonalności mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji docelowych sekwencji RNA wirusa BVDV.

## Izolacja RNA

Zestaw virotype BVDV 2.0 RT-PCR Kit jest przeznaczony do wykrywania RNA wirusa BVDV w próbkach krwi, osocza, surowicy, tkanek, mleka i tkanek małżowiny usznej pobranych od bydła.

Ze względu na wysoką czułość zestawu testowego możliwe jest testowanie odrębnych próbek oraz zbiorczych próbek. Próbki zbiorcze można utworzyć przy użyciu maksymalnie 25 próbek tkanek małżowiny usznej lub 50 odrębnych próbek krwi (krew, osocze, surowica) lub 50 próbek mleka. W przypadku próbek krwi i mleka możliwe jest zwiększenie liczby próbek ujętych w próbce zbiorczej do maksymalnie 100 odrębnych próbek.

**Uwaga:** W przypadku stosowania zestawu w Niemczech obowiązują specyfikacje wyszczególnione w dokumencie „*Amtliche Methodensammlung*”.

Przed wykonaniem reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym należy wyizolować wirusowe RNA z materiału wyjściowego.

**Opcjonalnie:** Egzogeną wewnętrzną kontrolę RNA (intype IC-RNA, nr

kat. IC289970) należy dodać do **buforu do lizy** przed rozpoczęciem procedury izolacji. W większości przypadków wystarczająca objętość materiału intype IC-RNA na próbkę to 2 µl, jednak należy przetestować, czy objętość ta jest odpowiednia dla wykorzystywanego systemu do izolacji.

Do szybkiego przygotowania próbek tkanek małżowiny usznej (średnica 2–3 mm) bez izolacji RNA zalecane jest użycie odczynnika virotype Tissue Lysis Reagent. Lizaty z tkanek małżowiny usznej należy bezzwłocznie przetestować. Można je przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 12 godzin lub w temperaturze od -20 do -80°C.

Firma INDICAL oferuje szeroki wachlarz zestawów zatwierdzonych do izolacji RNA z próbek zwierzęcych.

#### Izolacja przy użyciu kuleczek magnetycznych:

- **IndiMag® Pathogen Kit** (SP947457)
- **IndiMag Pathogen Kit w/o plastics** (SP947257)
- **IndiMag Pathogen IM48 Cartridge** (SP947654P608, SP947654P224)
- **IndiMag Pathogen KF96 Cartridge** (SP947855P196)

#### Izolacja przy użyciu kolumn wirówkowych:

- **IndiSpin® Pathogen Kit** (SP54104, SP54106)
- **IndiSpin QIAcube® HT Pathogen Kit** (SP54161)

#### Szybka liza

**virotype Tissue Lysis Reagent** (SP289992, SP289993)

Jeśli reakcja RT-PCR w czasie rzeczywistym nie jest wykonywana od razu po izolacji, RNA należy przechowywać w temperaturze -20°C lub, w przypadku przechowywania długoterminowego, w temperaturze -80°C.

W celu uzyskania dalszych informacji dotyczących zautomatyzowanej lub ręcznej izolacji RNA wirusa BVDV z próbek różnego typu należy zapoznać się z odpowiednią instrukcją obsługi lub skontaktować się z pomocą techniczną firmy INDICAL pod adresem **support@indical.com**.

# Sprzęt i odczynniki zapewniane przez użytkownika

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

- **Opcjonalnie** (produkt niezawarty w zestawie): intype IC-RNA (nr kat. IC289970, INDICAL BIOSCIENCE)
- Pipety
- Jałowe końcówki do pipet, wolne od nukleaz, odporne na aerozole, z filtrami
- Materiały eksploatacyjne wolne od nukleaz (wolne od RNazy/DNazy). Należy zachować szczególną ostrożność, aby uniknąć zanieczyszczenia nukleazami wszystkich odczynników i materiałów eksploatacyjnych używanych do przygotowywania reakcji PCR w celu czułej identyfikacji wirusowych kwasów nukleinowych
- Urządzenie chłodzące lub lód
- Wirówka laboratoryjna z rotorem dla probówek o pojemności 1,5 ml
- Cykler do wykonywania reakcji w czasie rzeczywistym, z odpowiednimi kanałami fluorescencyjnymi
- Oprogramowanie odpowiednie dla wybranego cyklera do wykonywania reakcji w czasie rzeczywistym
- Probówki w paskach i zatyczki lub 96-dołkowa mikro płytki optyczna z uszczelniającą folią optyczną lub pokrywką, odpowiednia dla wybranego cyklera do wykonywania reakcji w czasie rzeczywistym

# Ważne informacje

## Ogólne środki bezpieczeństwa

Użytkownik powinien zawsze zwracać uwagę na następujące kwestie:

- Używać końcówek do pipet wolnych od nukleaz, z filtrami.
- Materiały pozytywne (próbki, kontrole pozytywne i amplikony) przechowywać i przeprowadzać ich izolację oddzielnie od innych odczynników, a także dodawać je do mieszaniny reakcyjnej w osobnym miejscu.
- Przed rozpoczęciem oznaczenia rozmrozić wszystkie składniki zestawu na lodzie.
- Po rozmrożeniu wymieszać składniki, odwracając probówki, a następnie krótko odwirować.
- Nie używać składników zestawu testowego po upływie terminu ważności.
- Podczas przygotowywania reakcji trzymać próbki i kontrole na lodzie lub w bloku chłodzącym.

## Kontrola negatywna

W każdej reakcji PCR należy uwzględnić co najmniej jedną reakcję kontroli negatywnej, w której zawarte są wszystkie składniki reakcji z wyjątkiem matrycy patogenu. Umożliwia to ocenę zanieczyszczenia reakcji.

## Kontrola pozytywna

Podczas przeprowadzania reakcji PCR na nieznanach próbkach zalecane jest wykonanie reakcji kontroli pozytywnej — próbki, o której

wiadomo, że zawiera docelową sekwencję wirusowego RNA. Kontrola pozytywna służy do potwierdzenia funkcjonalności oznaczenia patogenu, np. prawidłowego przygotowania mieszaniny reakcyjnej. W celu przetestowania prawidłowej amplifikacji sekwencji docelowej należy użyć 5 µl odczynnika Positive Control dostarczonego z zestawem virotype BVDV 2.0 RT-PCR Kit.

## Kontrola izolacji i amplifikacji

W celu podwyższenia bezpieczeństwa i wygody procesu w tym zestawie testowym zawarte są dwa oznaczenia wykonywane w celu kontroli izolacji i amplifikacji.

Endogenna kontrola wewnętrzna (Endogenous Control, EC) służy do wykrywania genu  $\beta$ -aktyny obecnego w próbce, natomiast egzogenna kontrola wewnętrzna (Internal Control, IC) służy do wykrywania materiału in type IC-RNA, który musi zostać dodany do buforu do lizy przed procedurą izolacji (opcjonalne zastosowanie). Zastosowanie obu systemów kontroli umożliwia monitorowanie procesów izolacji i amplifikacji również w przypadku próbek, dla których będzie obserwowana co najmniej częściowa inhibicja reakcji wynikająca z niskiej jakości próbki. Podczas procedur szybkiej lizy nie jest wymagane stosowanie żadnej egzogennej kontroli wewnętrznej (IC-RNA).

# Protokół: Reakcja RT-PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania RNA wirusa wirusowej biegunki bydła (*Bovine Virus Diarrhea Virus*)

## Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Przed rozpoczęciem należy zapoznać się z sekcją „Ważne informacje” zamieszczoną na stronie 12.
- Zdecydowanie zalecane jest stosowanie materiału intype IC-RNA w celu monitorowania procesów izolacji i amplifikacji, a także ewentualnej częściowej inhibicji reakcji. Przed izolacją należy dodać odpowiednią objętość odczynnika do buforu do lizy.
- W każdej reakcji PCR uwzględnić co najmniej jedną kontrolę pozytywną (Positive Control) i jedną kontrolę negatywną (Negative Control).
- Przed rozpoczęciem procedury użytkownik powinien dokładnie przeczytać protokół i upewnić się, że potrafi obsługiwać wybrany cykler do wykonywania reakcji PCR w czasie rzeczywistym.
- RNA jest materiałem niestabilnym. Protokół należy wykonywać bez przerw.

## Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Rozmrozić wszystkie odczynniki na lodzie i chronić je przed światłem.
- Przed użyciem krótko odwirować odczynniki.
- Podczas przygotowywania reakcji PCR trzymać odczynniki na lodzie lub w bloczku chłodzącym.

## Procedura

1. Przed użyciem mieszaniny Master Mix wymieszaj ją, odwracając probówkę z mieszaniną 5 razy lub do momentu dokładnego wymieszania, a następnie krótko odwiruj w celu zebrania płynu na dnie probówki.
2. Za pomocą pipety przenieś 8 µl mieszaniny Master Mix do każdej probówki reakcyjnej. Następnie dodaj 5 µl próbki RNA (Tabela 1).

Uwzględnij reakcje kontroli pozytywnej i negatywnej.

Odczynnik Positive Control: Użyj 5 µl kontroli pozytywnej (Positive Control) zamiast próbki RNA.

Odczynnik Negative Control: Użyj 5 µl kontroli negatywnej (Negative Control) zamiast próbki RNA.

Tabela 1. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej

<b>Składnik</b>	<b>Objętość</b>
Mieszanina Master Mix	8 µl
Próbka	5 µl
<b>Łączna objętość</b>	<b>13 µl</b>

3. Zamknij probówki reakcyjne lub zaklej folią płytkę i odwróć je/ją 5 razy lub do momentu dokładnego wymieszania. Następnie krótko odwiruj probówki/płytkę w celu zebrania płynów na dnie probówek/płytki.
4. W oprogramowaniu termocyklera ustaw filtry dla barwników reporterowych zgodnie z Tabelą 2.

Tabela 2. Ustawienia filtrów dla barwników reporterowych

<b>Patogen/ kontrola wewnętrzna</b>	<b>Barwnik reporterowy</b>
BVDV	FAM
Endogenna kontrola wewnętrzna (EC)	HEX/ JOE™ <sup>1</sup>
Egzogenna kontrola wewnętrzna (IC)	Cy5
Pasywny barwnik referencyjny <sup>2</sup>	ROX™ <sup>2</sup>

1 Użyć opcji odpowiedniej dla używanego termocyklera.

2 Wewnętrzny barwnik referencyjny przeznaczony do użytku z systemami ABI PRISM® Sequence Detection Systems (Applied Biosystems®)

5. Uruchomić protokół reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym zgodnie z Tabelą 3.

Tabela 3. Protokół reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym dla oznaczenia BVDV 2.0

<b>Krok</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Czas</b>	<b>Liczba cykli</b>
<b>Odwrotna transkrypcja</b>	50°C	10 min	1
<b>Aktywacja wstępna</b>	95°C	2 min	1
<b>Cykl 2-etapowy</b>			
Denaturacja	95°C	5 s	40
Hybrydyzacja/Wydłużanie*	60°C	30 s	

\* Gromadzenie danych fluorescencyjnych, szacowany czas programu wynosi 64 min (CFX96, Bio-Rad™)

# Analiza i interpretacja danych

## Interpretacja wyników

Aby oznaczenie było ważne, odczynnik Positive Control musi dać sygnał w kanałach FAM, HEX i Cy5 przy  $C_T^1 < 35$ . Odczynnik Negative Control nie może dawać sygnału.

W przypadku pracy na nieznanach próbkach można otrzymać poniższe wyniki. Możliwe wyniki próbek podsumowano również w Tabeli 4 na stronie 20.

**Próbka jest pozytywna względem wirusa BVDV, a oznaczenie jest ważne, jeśli spełnione są następujące kryteria:**

- Próbka daje sygnał w kanale FAM (niezależnie od sygnału w kanale HEX i/lub Cy5).
- Odczynnik Positive Control daje sygnał we wszystkich kanałach.
- Odczynnik Negative Control nie daje sygnału w kanałach FAM, HEX i Cy5.

Należy zauważyć, że wysokie stężenia RNA wirusa BVDV w próbce mogą prowadzić do obniżenia lub braku sygnału dla kontroli wewnętrznych (kanał HEX w przypadku kontroli EC, kanał Cy5 w przypadku kontroli IC) z powodu kompetycji z kontrolami wewnętrznymi.

---

<sup>1</sup> Cykl progowy ( $C_T$ ) — cykl, w którym wykres amplifikacji przekracza wartość progową, tj. pierwszy wyraźnie wykrywalny wzrost fluorescencji

**Próbka jest negatywna względem wirusa BVDV, a oznaczenie jest ważne, jeśli spełnione są następujące kryteria:**

- Próbka **nie daje** sygnału w kanale FAM.
- W przypadku programu z materiałem intype IC-RNA: Próbka daje sygnał w kanałach HEX i Cy5.
- W przypadku programu bez materiału intype IC-RNA: Próbka daje sygnał w kanale HEX.
- Odczynnik Positive Control daje sygnał we wszystkich kanałach.
- Odczynnik Negative Control nie daje sygnału w kanałach FAM, HEX i Cy5.

**Wyniki próbki są niejednoznaczne, a oznaczenie jest nieważne, jeśli spełnione są następujące kryteria:**

- Próbka nie daje sygnału w żadnym kanale.

Jeśli nie wykryto żadnego sygnału, wynik jest niejednoznaczny.

Nieobecność sygnału fluorescencyjnego dla endogennej kontroli wewnętrznej (EC) i egzogennej kontroli wewnętrznej (intype IC-RNA, IC, dotyczy wyłącznie reakcji, w których używano tego materiału) wskazuje, że doszło do silnej inhibicji reakcji PCR i/lub wystąpiły inne błędy, np. podczas izolacji.

Aby sprawdzić, czy doszło do inhibicji reakcji, zalecamy rozcieńczenie próbki RNA w wodzie wolnej od nukleaz w stosunku 1:5 w celu powtórzenia izolacji RNA. Można również powtórzyć całą procedurę testową, używając nowego materiału próbki.

Sprawdzić, czy dla reakcji odczynnika Positive Control w kanałach FAM, HEX, i Cy5 otrzymywany jest sygnał fluorescencyjny. Nieobecność sygnału fluorescencyjnego dla odczynnika Positive Control wskazuje, że wystąpił błąd, który mógł być spowodowany nieprawidłowym przygotowaniem mieszaniny reakcyjnej lub nieprawidłowymi warunkami cykli.

### **Dodatkowe informacje otrzymywane dzięki zastosowaniu endogennej i egzogennej kontroli wewnętrznej:**

**Brak sygnału fluorescencyjnego w kanale Cy5** (dotyczy wyłącznie reakcji, w których używano materiału intype IC-RNA) może być spowodowany niezadowalającą izolacją próbki, inhibicją reakcji PCR lub kompetycją z silnie pozytywnym sygnałem dla wirusa BVDV. Sygnał ten nie będzie również obserwowany, jeśli przed przeprowadzeniem izolacji próbki do buforu do lizy nie dodano materiału intype IC-RNA. Wyższe wartości  $C_T$  w kanale Cy5 obserwowane dla danej próbki w stosunku do większości próbek mogą wskazywać na zajście częściowej inhibicji w próbce.

**Brak sygnału fluorescencyjnego w kanale HEX** przy obecności sygnału w kanale Cy5 wskazuje na niską jakość próbki i/lub niewystarczającą ilość próbki.

Tabela 4. Tabela interpretacji wyników\*

Wynik próbki	<i>Opcjonalnie:</i>			Interpretacja
	FAM (BVDV)	HEX (EC)	Cy5 (IC-RNA)	
Pozytywna względem BVDV	X	X	X	Wynik ważny
Pozytywna względem BVDV	X	X		Wynik ważny (izolacja bez materiału intype IC-RNA)
Silnie pozytywna względem BVDV	X	(X)	(X)	Wynik ważny (brak sygnału dla kontroli EC i/lub IC ze względu na kompetycję)
Negatywna względem BVDV		X	X	Wynik ważny
Niska jakość próbki		X	X	Słaby sygnał dla kontroli EC z powodu niskiej jakości próbki; zalecane przetestowanie nowej próbki
Częściowa inhibicja reakcji PCR		X	(X)	Brak wartości C <sub>T</sub> lub niska wartość dla materiału IC-RNA (zalecane wykonanie testu dla próbki rozcieńczonej w stosunku 1:5)
Wynik niejednoznaczny			(X)	Brak sygnału dla kontroli EC i IC prawdopodobnie spowodowany nieprawidłowym przebiegiem izolacji lub reakcji PCR

\* Dokonanie interpretacji wyników jest możliwe, pod warunkiem że wykonano reakcje kontroli pozytywnej i kontroli negatywnej. Odczynnik Positive Control musi dawać sygnał w kanałach FAM, HEX i Cy5. Odczynnik Negative Control nie może dawać sygnału w żadnym kanale. Pełne objaśnienie możliwych wyników próbki zawiera część „Analiza i interpretacja danych” na stronie 17.

Firma INDICAL oferuje szeroki wachlarz zestawów testowych ELISA oraz zestawów do reakcji PCR w czasie rzeczywistym i RT-PCR w czasie rzeczywistym przeznaczonych do wykrywania patogenów zwierzęcych.

Aby uzyskać więcej informacji na temat produktów bactotype, cador, cattletype, flocktype, pigtype, Svanovir i virotype, należy odwiedzić stronę **[www.indical.com](http://www.indical.com)**.

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu firmy INDICAL.

Uwagi

## Uwagi

## Umowa ograniczonej licencji dla zestawu virotype BVDV 2.0 RT-PCR Kit

Korzystanie z tego produktu oznacza zgodę nabywcy lub użytkownika produktu na następujące warunki:

1. Niniejszy produkt może być użytkowany wyłącznie zgodnie z protokołem dołączonym do produktu oraz niniejszą instrukcją i wyłącznie ze składnikami znajdującymi się w tym zestawie. Firma INDICAL nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania niniejszego zestawu ze składnikami nienależącymi do zestawu z wyjątkiem przypadków opisanych w protokołach dołączonych do produktu, niniejszej instrukcji oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie [www.indical.com](http://www.indical.com). Niektóre dodatkowe protokoły zostały sformułowane przez użytkowników rozwiązań INDICAL z myślą o innych użytkownikach rozwiązań INDICAL. Takie protokoły nie zostały dokładnie przetestowane ani poddane procesowi optymalizacji przez firmę INDICAL. Firma INDICAL nie gwarantuje, że nie naruszają one praw osób trzecich.
2. Z wyjątkiem wyraźnie określonych licencji, firma INDICAL nie udziela gwarancji, że niniejszy zestaw i/lub jego użytkowanie nie narusza praw osób trzecich.
3. Zestaw oraz jego składniki są przeznaczone do jednorazowego użytku, nie można ich ponownie używać, regenerować ani odsprzedawać.
4. Firma INDICAL nie udziela innych licencji wyrażonych lub dorozumianych poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej. Firma INDICAL może egzekwować zakazy niniejszej Umowy ograniczonej licencji w sądzie i będzie dochodzić odzyskania wszystkich kosztów sądowych i procesowych, w tym wynagrodzeń prawników, w odniesieniu do wszelkich działań, które będą miały na celu wykonanie postanowień niniejszej Umowy ograniczonej licencji lub praw do własności intelektualnej związanych z tym zestawem i/lub jego składnikami.

Aktualne warunki licencji są dostępne na stronie [www.indical.com](http://www.indical.com).

**Znaki towarowe:** afosa<sup>®</sup>, bactotype<sup>®</sup>, cadof<sup>®</sup>, cattletype<sup>®</sup>, flocktype<sup>®</sup>, pigtype<sup>®</sup>, Svanovir<sup>®</sup>, virotype<sup>®</sup> (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); ABI PRISM<sup>®</sup> (Applied Biosystems); Bio-Rad<sup>™</sup> (Bio-Rad Laboratories, Inc.); FAM<sup>™</sup>, HEX<sup>™</sup>, JOE<sup>™</sup>, ROX<sup>™</sup> (Life Technologies Corporation); Cy<sup>®</sup> (GE-Healthcare); Eppendorf<sup>®</sup> (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH). Sondy objęte licencją są wytwarzane przez firmę Integrated DNA Technologies, Inc. Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały oznaczone jako zastrzeżone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa.

HB-2575-EN-002 © 2022 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, wszelkie prawa zastrzeżone.

## Indeks zmian

Instrukcja obsługi	Wersja	Zmiana
HB-2575-EN-002	Lipiec 2022 r.	Zmiany edytorskie
HB-2575-EN-001	Marzec 2022 r.	Wprowadzenie produktu na rynek

**INDICAL**  
BIOSCIENCE

Składanie zamówień: [www.indical.com/contact](http://www.indical.com/contact)  
Pomoc techniczna: [support@indical.com](mailto:support@indical.com)  
Strona WWW: [www.indical.com](http://www.indical.com)