

virotype[®] Influenza A 2.0 RT-PCR Kit

Instrukcja obsługi

Do wykrywania RNA wirusa Influenza A

Produkt licencjonowany zgodnie z §11 (2) niemieckiej ustawy o ochronie zdrowia zwierząt Nr pozwolenia na wprowadzenie do obrotu: FLI-C 116



100 reakcji (nr kat. VT282625)



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

Zawartość

Zawartość	2
Zawartość zestawu	3
Przeznaczenie	3
Symbole	4
Kontrola jakości	5
Przechowywanie	5
Informacje dotyczące bezpieczeństwa	5
Wstęp	6
Zasada działania	7
Izolacja RNA	8
Sprzęt i odczynniki zapewniane przez użytkownika	9
Ważne informacje	11
Ogólne środki bezpieczeństwa	11
Protokół: Reakcja RT-PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania RNA wirusa Influenza A	13
Ważne informacje przed rozpoczęciem	13
Czynności do wykonania przed rozpoczęciem	13
Procedura	14
Analiza i interpretacja danych	16
Interpretacja wyników	16
Indeks zmian	20

Zawartość zestawu

virotype Influenza A 2.0 RT-PCR Kit	(100)
Nr kat.	VT282625
Liczba reakcji	100
Master Mix (Mieszanina Master Mix) (próbówka z pomarańczową zatyczką) zawiera enzymy, startery i sondy	2 x 1000 µl
Positive Control (Kontrola pozytywna) (próbówka z czerwoną zatyczką)	1 x 150 µl
Negative Control (Kontrola negatywna) (próbówka z niebieską zatyczką)	1 x 150 µl
Instrukcja obsługi	1

Przeznaczenie

Zestaw virotype Influenza A 2.0 RT-PCR Kit jest przeznaczony do wykrywania RNA wirusa Influenza A w wymazach z jamy ustno-gardłowej, tchawicy i kloaki (próbki pojedyncze lub zbiorcze), próbkach kału oraz próbkach tkanek pobranych od ptaków; wymazach z nosa, płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) oraz próbkach tkanek pobranych od świń, jak również wymazach z nosa pobranych od koni.

Zestaw został zatwierdzony przez instytut Friedrich-Loeffler-Institut i jest licencjonowany zgodnie z §11 (2) niemieckiej ustawy o ochronie zdrowia zwierząt (FLI-C 116) 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 ptaków, świń i koni

Kontrola jakości

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

Przechowywanie

Składniki zestawu virotype Influenza A 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**.

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

Wstęp

Zestaw virotype Influenza A 2.0 RT-PCR Kit to bezpieczne rozwiązanie charakteryzujące się wysoką czułością detekcji RNA wirusa Influenza A w próbkach pobieranych od ptaków, świń i koni.

Wirus Influenza A to otoczkowy, jednoniciowy wirus RNA należący do rodziny *Orthomyxoviridae* i rodzaju *Alphainfluenzavirus*. Wirusy Influenza A charakteryzują się dużą różnorodnością genetyczną i szerokim zakresem wirulencji. Wirusy te dzielą się na szczepy nisko- i wysokopatogenne. Naturalny rezerwuar wirusów grypy ptaków o niskiej patogenności (Low Pathogenic Avian Influenza Virus, LPAIV) stanowi ptactwo wodne. Do wirusów grypy ptaków o wysokiej patogenności (Highly Pathogenic Avian Influenza Virus, HPAIV) należą podtypy H5 i H7, które mogą wywoływać ptasią grypę u drobiu, powodując tym samym wysokie straty ekonomiczne.

Podtypy H1N1, H1N2 i H3N2 wirusa Influenza A mogą również wywoływać zakażenia dróg oddechowych u świń, podobnie jak podtyp H3N8 w przypadku koni.

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

W zestawie virotype Influenza A 2.0 RT-PCR Kit wykorzystywane są dwie kombinacje swoistych starterów/sond:

- Barwnik fluorescencyjny FAM™ dla RNA wirusa Influenza A
- Barwnik fluorescencyjny HEX™ dla endogennej kontroli wewnętrznej (EC; β -aktyna obecna w próbce)

Odczynnik Positive Control służy do weryfikowania działania mieszaniny reakcyjnej podczas amplifikacji docelowych sekwencji RNA wirusa Influenza A.

Izolacja RNA

Zestaw virotype Influenza A 2.0 RT-PCR Kit może być używany do wykrywania RNA wirusa Influenza A w następujących typach próbek:

- Ptaki: wymazy z jamy ustno-gardłowej, tchawicy i kloaki (próbki pojedyncze lub zbiorcze), próbki kału oraz próbki tkanek
- Świnie: wymazy z nosa, płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) i próbki tkanek
- Konie: wymazy z nosa

Ze względu na wysoką czułość testu możliwe jest analizowanie próbek zbiorczych złożonych z maksymalnie 10 pojedynczych próbek w postaci wymazów.

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.

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

Izolacja przy użyciu kuleczek magnetycznych:

- **IndiMag® Pathogen Kit** (SP947457)
- **IndiMag Pathogen Kitw/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)

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 i ręcznej izolacji RNA wirusa Influenza A 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 odpowiednimi kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) dostępnymi u dostawcy produktu.

- Pipety
- Jałowe końcówki do pipet, wolne od nukleaz, odporne na aerozole, z filtrami
- Jałowe próbówki Eppendorf® o pojemności 1,5 ml

- Materiały eksploatacyjne wolne od nukleaz (wolne od RNaz/DNaz). 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 i zatyczki w paskach lub 96-dołkowa mikroplątka 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 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 skażenia 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 prawidłowego przebiegu oznaczenia patogenu, np. prawidłowego przygotowania mieszaniny reakcyjnej. W celu sprawdzenia, czy amplifikacja sekwencji docelowej przebiega w prawidłowy sposób, w teście należy uwzględnić 5 µl odczynnika Positive Control dostarczonego z zestawem virotype Influenza A 2.0 RT-PCR Kit.

Kontrola izolacji i amplifikacji

W celu podwyższenia bezpieczeństwa i wygody procesu w tym zestawie testowym zawarte jest jedno oznaczenie wykonywane w celu kontroli izolacji i amplifikacji.

Endogenna kontrola wewnętrzna (Endogenous Control, EC) służy do wykrywania genu β -aktyny obecnego w próbce. Umożliwia to monitorowanie izolacji i amplifikacji.

Protokół: Reakcja RT-PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania RNA wirusa Influenza A

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Przed rozpoczęciem należy zapoznać się z sekcją „Ważne informacje” zamieszczoną na stronie 11.
- 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 cyklicznie 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 20 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

Składnik	Objętość
Mieszanina Master Mix	20 µl
Próbka	5 µl
Łączna objętość	25 µl

3. Zamknij probówki reakcyjne lub zaklej folią płytkę i odwróć je/ją 5 razy lub do momentu dokładnego wymieszania. Następnie krótko odwiruj probówki w celu zebrania płynów na dnie.

4. W oprogramowaniu termocyklera ustaw filtry dla barwników reporterowych zgodnie z Tabelą 2.

Tabela 2. Ustawienia filtrów dla barwników reporterowych

Patogen/ kontrola wewnętrzna	Barwnik reporterowy
Wirus Influenza A	FAM
Endogenna kontrola wewnętrzna (EC)	HEX™ ¹
Pasywny barwnik referencyjny ²	ROX™

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 PCR w czasie rzeczywistym zgodnie z Tabelą 3.

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

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

* Gromadzenie danych fluorescencyjnych, szacowany czas programu wynosi 67 min (Mx3005P®, Agilent Technologies, Inc.)

Analiza i interpretacja danych

Interpretacja wyników

Aby oznaczenie było ważne, odczynnik Positive Control musi dać sygnał w kanałach FAM i HEX 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 18.

Próbka jest pozytywna pod kątem wirusa Influenza A, a oznaczenie jest ważne, jeśli spełnione są następujące kryteria:

- Próbka daje sygnał w obu kanałach: FAM i HEX.
- Odczynnik Positive Control daje sygnał w obu kanałach: FAM i HEX.
- Odczynnik Negative Control nie daje sygnału w kanałach FAM i HEX.

Należy pamiętać, że bardzo wysokie stężenia RNA wirusa Influenza A w próbce mogą prowadzić do obniżenia lub braku sygnału w kanale HEX z powodu kompetycji z kontrolą wewnętrzną.

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

Próbka jest negatywna pod kątem wirusa Influenza A, a oznaczenie jest ważne, jeśli spełnione są następujące kryteria:

- Próbka daje sygnał w kanale HEX, ale nie daje sygnału w kanale FAM.
- Odczynnik Positive Control daje sygnał w obu kanałach: FAM i HEX.
- Odczynnik Negative Control nie daje sygnału w kanałach FAM i HEX.

Pozytywny sygnał w kanale HEX oznacza, że izolacja i amplifikacja zostały wykonane pomyślnie, gdyż zaszła amplifikacja genu metabolizmu podstawowego (β -aktyny) obecnego w próbce.

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

- Próbka nie daje sygnału w kanałach FAM i HEX.

Jeśli w kanałach FAM (wirus Influenza A) i HEX (endogenna kontrola wewnętrzna (Endogenous Control, EC)) nie zostanie wykryty żaden sygnał, wynik jest niejednoznaczny. Nieobecność sygnału fluorescencyjnego dla genu metabolizmu podstawowego 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 we wszystkich kanałach 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.

Tabela 4. Tabela interpretacji wyników*

Wynik próbki	FAM (wirus Influenza A)	HEX (EC)
Influenza A — wynik pozytywny	X	X
Influenza A — wynik silnie pozytywny	X	
Influenza A — wynik negatywny		X
Wynik niejednoznaczny		

* Dokonanie interpretacji wyników jest możliwe, pod warunkiem że wykonano reakcje kontroli pozytywnej i kontroli negatywnej. Odczynnik Positive Control musi dawać sygnał w kanałach FAM i HEX. Odczynnik Negative Control nie może dawać sygnału w żadnym kanale.

Pełne objaśnienie możliwych wyników próbki zawiera część „Analiza i interpretacja danych” na stronie 16.

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**.

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

Umowa ograniczonej licencji dla zestawu virotype Influenza A 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 protokołami dołączonymi 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. 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 przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu. Ma także prawo zażądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencji są dostępne na stronie www.indical.com.

Znaki towarowe: afosa[®], bactotype[®], cadorf[®], cattletype[®], flocktype[®], pigtype[®], Svanovir[®], virotype[®] (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); ABI PRISM[®] (Applied Biosystems); FAM[™], HEX[™], JOE[™], ROX[™] (Life Technologies Corporation); Eppendorf[®] (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH); Mx3005P[®] (Agilent Technologies, Inc.). 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-2577-EN-001 © 2022 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, wszelkie prawa zastrzeżone.

Indeks zmian

Instrukcja obsługi	Wersja	Zmiana
HB-2577-EN-001	Wrzesień 2022 r.	Wprowadzenie produktu na rynek