

RealPCR* CSFV RNA Test

English Version

Real-time PCR detection of
Classical swine fever virus RNA



Version française

Détection de l'ARN du
virus de la Peste Porcine Classique par PCR en temps réel



Versão em Português

PCR em tempo real para detecção do
RNA do Vírus da Peste Suína Clássica



Versión Española

Detección de ARN del
Virus de la Peste Porcina Clásica por PCR en tiempo real



Versione italiana

PCR in tempo reale per la rilevazione
dell'RNA del virus della Peste Suina Classica



Русская версия

Выявление РНК возбудителя классической
чумы свиней методом ПЦР в реальном времени



Wersja polska

Wykrywanie RNA wirusa
klasycznego pomoru świń metodą PCR w czasie rzeczywistym



Deutsche Version der Gebrauchsinformation

Nachweis der RNA des Virus der
klassischen Schweinepest mittels Real-Time PCR



REF 99-56022

 **Version**
06-56022-01

*This insert is not for a product available to U.S. or Canadian customers.
Please refer to the RealPCR insert webpage and select "United States
or Canada" to view the correct product insert.*

Test With Confidence™

IDEXX



MENU



PRINT

English version

RealPCR* CSFV RNA Test

For veterinary use only

Name and Intended Use

The RealPCR* CSFV RNA Test is used for the detection of classical swine fever virus (CSFV) RNA extracted from blood (EDTA), serum, plasma, oral fluids, swab samples or tissue (spleen, kidney, lymph node and tonsil) from swine, including wild boars. Tissue samples can be tested in pools of up to 10 samples and blood (EDTA), plasma and serum can be tested in pools of up to 20 samples. Oral fluids can be tested as a composite sample taken from pens of up to 30 pigs. Pools containing a single weak sample (for example, Ct > 32) may yield a negative result due to the dilution effect of pooling.

General Information

CSFV is the causative agent of classical swine fever (CSF), a highly contagious hemorrhagic disease affecting wild and domestic pigs. CSF is characterized by high morbidity and mortality rates, causing serious economic losses to the pig industry, and it is a World Organization for Animal Health (OIE)-listed disease.

Pigs infected with CSFV may shed a high amount of virus before showing clinical signs of the disease. If animals survive an acute or sub-acute infection, they can become chronically infected and excrete the virus intermittently or continuously until death. In pregnant sows, CSFV is able to cross the placenta and infect fetuses, causing abortions, fetal mummifications and stillborns. In mid-gestation infections (~50–70 days of pregnancy), weak or persistently viremic piglets can be born. These persistently infected piglets are able to shed high levels of virus for several months.

The IDEXX* RealPCR system is a modular format in which disease-specific target mixes are paired with a standardized DNA or RNA master mix and a single pooled positive control. Reagents are individually packaged and sold separately to allow for flexible reagent handling.


The RealPCR CSFV RNA Mix (CSFV RNA Mix) contains primers and probes for the detection of CSFV RNA when amplified with RealPCR RNA Master Mix (RNA MMx). The assay is a single-tube reverse transcriptase and polymerase reaction. The internal control for the test is based on the detection of an endogenous porcine RNA sequence present in the host sample and is referred to as the internal sample control (ISC) in this protocol. Detection of endogenous RNA in swine samples controls for sample addition, extraction and amplification. Primers and probe for detection of the internal sample control are included in the CSFV RNA Mix. An optional internal positive control, the RealPCR Internal Positive Control (IPC ≥ v1.1), is also available and should be used when endogenous host RNA is at low levels or unlikely to be present after extraction (such as environmental samples). The IPC contains a synthetic version of the swine ISC RNA target and is therefore compatible with the CSFV RNA Mix. Refer to the RealPCR Internal Positive Control (REF 99-56330) product insert for guidance.

Materials and Storage

Identification/ General Information	Cap color	Quantity	Storage		Freeze/Thaw cycles
		100 tests	At receipt	After reconstitution	
RealPCR[®] CSFV RNA Mix (CSFV RNA Mix), dried	Yellow	1 x 1.0 mL	-25 to 8°C	-25 to -15°C	≤6
<p>[REF] 99-56022</p> <p>Reconstitute to 1 mL in PCR Grade Water. Store the CSFV RNA Mix in the dark. The expiration date on the vial is valid for either the dry or reconstituted form. The CSFV RNA Mix tube label indicates the PC version that is compatible with that target mix. For example, PC ≥ v1.4 means the target mix can be used with PC versions greater or equal to 1.4.</p>					
RealPCR RNA Master Mix (RNA MMx)	Black	1 x 1.0 mL	-25 to -15°C (Long-term)	N/A	≤6
<p>[REF] 99-56280</p> <p>Concentrated master mix that includes reverse transcriptase and hot-start polymerase for use with RNA target mixes in the IDEXX RealPCR system. The RNA MMx is more viscous than most master mixes— see the Test Procedure section for handling recommendations. A reference dye (ROX[®]) has been added for normalizing volume inaccuracies. Protect the RNA MMx from light.</p>					
RealPCR Positive Control, dried (PC)	Blue	1 x 500 μL	-25 to 8°C	-25 to -15°C	≤6
<p>[REF] 99-56310</p> <p>Reconstitute to 500 μL in PCR Grade Water. The PC contains all IDEXX[®] RealPCR and ISC targets (including the target for CSFV) and is intended for use with all IDEXX RealPCR target mixes. The expiration date on the vial is valid for either the dry or reconstituted form. The PC has a version number (such as v1.3). When new target mixes are developed for the RealPCR product line, the target sequences are added to the PC and the PC version number increases (for example, v1.3 would be updated to v1.4).</p> <p>The PC includes the IDEXX Signature (a unique oligonucleotide sequence). Presence of the IDEXX Signature, in the work environment, indicates PC contamination. For laboratories that want to monitor for PC contamination, the IDEXX Signature can be detected using the RealPCR PC Tracker DNA Mix and RealPCR DNA MMx.</p>					
RealPCR PCR Grade Water	Clear	2 x 1.0 mL	-25 to 8°C		N/A
<p>[REF] 99-56350</p> <p>PCR Grade Water has been qualified for reverse transcription-PCR (RT-PCR) use. It is used for the reconstitution of RealPCR reagents. It is also used as the PCR negative control for each test run. Do not transfer PCR Grade Water vials between PCR work areas. Separate vials of water are needed for each area to avoid contamination risk.</p>					

Note: See table at the end of the insert for a description of symbols used on the insert and labels.

Materials Required but Not Provided

- Commercial RNA extraction kit
 - Optional—Centrifuge with a rotor and adapters for multi-well plates
 - Micro-centrifuge for 2 mL microtubes capable of reaching 1500 – 3000 x g
 - Appropriate personal protective equipment (e.g., gloves, lab coat)
 - Nuclease-free, aerosol-resistant pipette tips
 - Sterile microtubes for preparation of PCR Mix
 - Pipettes (5–1000 μ L); dedicated pipettes for preparation of PCR Mix
 - 96- or 384-well format PCR plates and optical adhesive film/plate covers
 -  Real-time PCR instrument (Applied Biosystems[®] 7500, Applied Biosystems[®] 7500 Fast System (Standard and Fast Mode), Applied Biosystems[®] ViiA[®] 7, Applied Biosystems QuantStudio 5, Applied Biosystems QuantStudio[®] Flex, Agilent Mx3000P[®], Agilent Mx3005P[®], Agilent AriaMx, Bio-Rad CFX96 Touch[®], Bio Molecular Systems Mic qPCR Cycler, QIAGEN[®] Rotor-Gene (72-Well Rotor only), Roche LightCycler[®] 480 or equivalent).
- Note-** the Roche LC480 instrument requires additional calibration and software settings. IDEXX[®] Technical Service can provide guidance for use of the instruments mentioned above with RealPCR[®] reagents.

Laboratory Practices and Warnings


- Do not use reagents past expiration date.
- The entire procedure must be performed under nuclease-free conditions.
- Wear powder-free gloves when working with the reagents and nucleic acids.
- To avoid cross-contamination, use nuclease-free, aerosol-resistant pipette tips for all pipetting, and physically separate the workplaces for nucleic acid extraction/handling, PCR setup and PCR.

Reconstitution of Dried Components

Reconstitute the CSFV RNA Mix and Positive Control by pipetting PCR Grade Water to the volume indicated on the component label. Allow to sit at 18 to 26°C for at least 10 minutes; mix and microcentrifuge briefly prior to use. Once the CSFV RNA Mix and the Positive Control are reconstituted, aliquot as appropriate and store the solutions frozen. When handling frozen components, thaw at 18 to 26°C for approximately 15 to 30 minutes, mix gently and then microcentrifuge briefly (~1,500 – 3,000 x g).

RNA Extraction

The CSFV RNA Mix has been validated using the commercial extraction methods listed below. Other extraction or lysis methods may also be used once validated by the laboratory.

-  RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX)
- RealPCR DNA/RNA Spin Column Kit (IDEXX)
- NucleoSpin RNA Kit (Machery Nagel)
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)

Store the purified RNA at <-15°C if testing is not performed immediately after RNA extraction. It is recommended that a negative extraction control (mock sample) is included as a sample.

Test Procedure

- 1 Preparation of the PCR Mix.
 - Mix the thawed RNA MMx by inversion or gentle vortex.
 - The RNA MMx is a viscous solution; always pipette it slowly.
 - To prepare the PCR Mix add 10 μL CSFV RNA Mix and 10 μL RNA MMx for each reaction.
 - When preparing the PCR Mix, first pipette CSFV RNA Mix into the tube and then add the RNA MMx. Pipette up and down a few times to rinse the MMx pipette tip.
 - Gently vortex the solution to ensure the components are mixed well.
 - Pipette the PCR Mix slowly into the PCR plate.

Load the PCR plate within 20 minutes or store at 2 to 8°C for up to 4hrs. The PCR Mix can be stored at –25 to –15°C for up to 2 weeks. Protect from light.
- 2 Pipette 20 μL of the PCR Mix into the required wells of the multiwell plate.
- 3 Add 5 μL of sample RNA to each well. The final reaction volume is 25 μL .
- 4 Include the Positive Control (5 μL) and PCR Negative Control (5 μL PCR Grade Water) for each test run.
- 5 Cover the plate and briefly spin the plate, if necessary, to settle contents and remove air bubbles.
- 6 Set up thermal cycler with IDEXX® RealPCR® Standard DNA/RNA Cycling Program.

Settings for Reporter and Quencher

<u>Target</u>	<u>Reporter</u>	<u>Quencher</u>
CSFV	FAM*	BHQ* (none)
Internal Control (ISC/IPC)	HEX* (VIC)	BHQ (none)
Passive Reference	ROX*	N/A

RealPCR Standard DNA/RNA Cycling Program

	<u>Temperature</u>	<u>Time</u>	<u>Cycles</u>
Reverse transcription (RT)	50°C	15 min.	1
Denaturation	95°C	1 min.	1
Amplification [§]	95°C	15 sec.	45
	60°C	30 sec.	

[§]Ensure the instrument is set to record fluorescence following the 60°C amplification step.

7 Analyze data

When setting up the instrument software, assign a unique identifier to each target and internal control. For example, when target A and B are on the same plate, the A wells must be analyzed independently from the B wells. Refer to specific instrument's user manual for guidance on how to analyze data. To set the threshold, use the Auto Ct setting.

- Agilent Mx3000P* and Mx3005P* – ensure the background-based threshold fluorescence method is being used for analysis.
- QIAGEN* Rotor-Gene instrument – manually adjust the threshold line above background in the linear phase of exponential amplification. This is best done on log view plots and should be repeated for each reporter in the target mix.
- Applied Biosystems* instruments – In certain situations the auto threshold setting does not produce satisfactory results. In these situations, a manual adjustment of the threshold is necessary to determine Ct values. This is best done on log view plots and should be repeated for each reporter in the target mix.

Validity Criteria

	<u>FAM*</u> Ct value	<u>HEX* (VIC)</u> Ct value
Positive Control	<38	<38
PCR Negative Control	No Signal	No Signal

8 Interpretation of results

<u>Sample Result</u>	<u>FAM Signal</u>	<u>HEX (VIC) Signal</u>	<u>Other characteristics</u>
CSFV RNA detected	Yes	Yes/No	A positive Ct value and characteristic amplification curve in comparison to the PCR Negative Control. An internal control amplification curve in the HEX (VIC) channel is expected; some strong CSFV-positive RNA samples may result in a negative internal control result. [†]
CSFV RNA not detected	No	Yes	Amplification curve in the HEX (VIC) internal control channel.
Invalid [‡]	No	No	Absence of an amplification curve in the FAM and HEX (VIC) channels indicates an invalid result.

[†]The target mix is optimized for the detection of CSFV RNA; a strong positive RNA sample may out compete the detection of the internal control.

[‡]An invalid sample can be an indication of failed sample addition, extraction and/or PCR. It is recommended that the RNA be diluted five-fold into PCR grade water and retested; include the undiluted RNA as a sample. If the test is still not valid a new extraction is recommended.

For technical assistance:


IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 or +1 207 556 4895

IDEXX Europe Tel: +800 727 43399

Contact your IDEXX area manager or distributor or visit our website: idexx.com/contact/ptd

Patent information: idexx.com/patents

©2024 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.

 Dye compounds in this product are sold under license from Biosearch Technologies, Inc. and protected by U.S. and world-wide patents either issued or in application. This license covers veterinary and human applications, limited to research and development and diagnostic use.

*IDEXX, RealPCR and Test With Confidence are trademarks or registered trademarks of IDEXX Laboratories or its affiliates in the United States and/or other countries. All other product and company names and logos are trademarks or registered trademarks of their respective holders.



MENU



IMPRIMER

Version française

RealPCR* CSFV RNA Test

Réservé à l'usage vétérinaire

Nom et utilisation prévue

Le RealPCR* CSFV RNA Test est utilisé pour la détection de l'ARN du virus de la peste porcine classique (PPC), extrait à partir d'échantillons de sang (EDTA), sérum, plasma, fluides oraux, écouvillons ou tissus (rate, rein, ganglions lymphatiques et amygdales) provenant de porcs y compris les sangliers.

Les échantillons peuvent être analysés en mélanges de maximum 10 échantillons individuels de tissus et de maximum 20 échantillons individuels de sang (EDTA), de plasma ou de sérum. Les échantillons des fluides oraux peuvent être analysés en mélanges obtenus sur un parc de 30 porcs maximum. Les mélanges contenant un échantillon faiblement positif (par exemple Ct > 32) peuvent donner un résultat négatif dû à l'effet de dilution dans le mélange.

Informations générales

Le virus de la peste porcine classique (CSFV) est l'agent responsable de la peste porcine classique (PPC), une maladie hémorragique hautement contagieuse qui touche les porcs sauvages et domestiques. Le CSFV se caractérise par une morbidité élevée et un fort taux de mortalité. À l'origine de graves dégâts économiques pour l'industrie porcine, elle est inscrite sur la liste des maladies à déclaration obligatoire de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE).

Les porcs qui contractent le CSFV peuvent l'excréter en grande quantité avant de faire état de signes cliniques de la maladie. Si les animaux survivent à une forme aiguë ou subaiguë de l'infection, ils peuvent devenir infectés de façon chronique et excréter le virus de façon intermittente ou continue jusqu'à leur mort. Chez les truies gestantes, le CSFV peut traverser le placenta et infecter les fœtus, provoquant ainsi des avortements, des momifications fœtales et des porcelets mort-nés. Si l'infection survient au milieu de la gestation (~50–70 jours après insémination), les porcelets risquent de naître affaiblis ou en état de virémie persistante. Ces porcelets infectés de manière persistante peuvent excréter le virus en grande quantité pendant plusieurs mois.

Le système IDEXX* RealPCR a un format modulaire dans lequel chaque mix maladie/cible spécifique est associé au master mix DNA ou RNA et au contrôle positif commun. Les réactifs sont conditionnés individuellement et vendus séparément pour une gestion flexible des réactifs.

Le RealPCR CSFV RNA Mix (CSFV RNA Mix) contient des amorces et des sondes permettant de détecter l'ARN CSFV lorsque celui-ci est amplifié à l'aide du RealPCR RNA Master Mix (RNA MMx). Le test consiste en une réaction en chaîne par la polymérase et la transcriptase inverse en un seul tube. Le contrôle interne du test est basé sur la détection d'une séquence ARN endogène porcine présent dans l'échantillon et est appelé le contrôle d'échantillon interne (Internal Sample Control ou ISC) dans le présent protocole. La détection de cet ARN endogène dans les échantillons porcins contrôle l'ajout, l'extraction et l'amplification d'échantillon. Les amorces et les sondes pour la détection du contrôle d'échantillon interne sont incluses dans le CSFV RNA Mix. Un contrôle positif interne en option, le RealPCR Internal Positive Control (IPC \geq v1.1), est également disponible. Il est recommandé de l'utiliser lorsque l'ARN hôte endogène n'est présent qu'à un faible taux ou peu susceptible d'être présent après extraction (par exemple dans le cas d'échantillons environnementaux). L'IPC contient une version synthétique de l'ARN porcine ISC cible et est donc compatible avec le CSFV RNA Mix. Se référer au mode d'emploi du RealPCR Internal Positive Control (REFI 99-56330) pour plus d'informations.

Matériel et conservation

Identification/ Informations générales	Couleur du bouchon	Quantité	Conservation		Cycles de congélation/ décongélation
		100 tests	À réception	Après reconstitution	
RealPCR[®] CSFV RNA Mix (CSFV RNA Mix), déshydraté	Jaune	1 x 1,0 ml	-25 à 8°C	-25 à -15°C	≤6
<p>[REF] 99-56022</p> <p>A reconstituer avec 1 ml d'eau de qualité PCR. Conserver le CSFV RNA Mix à l'abri de la lumière. La date d'expiration mentionnée sur l'étiquette du flacon est valable aussi bien pour la forme « déshydratée » que « reconstituée ». La version du Positif Control (PC) qui est compatible avec ce mix cible est également indiquée sur l'étiquette. Par exemple, PC ≥ 1.4 signifie que le mix cible peut être utilisé avec toute version de PC dont la version est supérieure ou égale à 1.4.</p>					
RealPCR RNA Master Mix (RNA MMx)	Noir	1 x 1,0 ml	-25 à -15°C (long terme)	NA	≤6
<p>[REF] 99-56280</p> <p>Master Mix concentré incluant la transcriptase inverse et la polymérase à activer par la chaleur pour une utilisation avec les RNA mixes cibles du système IDEXX[®] RealPCR. Le RNA MMx est plus visqueux que la plupart des master mixes. Voir la section Mode opératoire pour consulter les recommandations relatives à la manipulation. Un fluorophore de référence (ROX[™]) a été ajouté afin de normaliser les imprécisions en terme de volume. Protéger le RNA MMx de la lumière.</p>					
RealPCR Positive Control (PC), déshydraté	Bleu	1 x 500 µl	-25 à 8°C	-25 à -15°C	≤6
<p>[REF] 99-56310</p> <p>A reconstituer avec 500 µl d'eau de qualité PCR. Le PC contient toutes les cibles IDEXX RealPCR et ISC (y compris les cibles pour CSFV) et est destiné à être utilisé avec tous les mixes cibles IDEXX RealPCR. La date d'expiration mentionnée sur l'étiquette du flacon est valable aussi bien pour la forme « déshydratée » que « reconstituée ». Le PC porte un numéro de version ("v1.3" par exemple). Lorsque de nouveaux mixes cibles RealPCR sont développés, les nouvelles séquences cibles sont ajoutées au PC et le numéro de version de celui-ci est incrémenté (par exemple "v1.3" sera mis à jour et deviendra "v1.4").</p> <p>Le contrôle positif (PC) contient la séquence IDEXX Signature (séquence d'oligonucléotide unique). La présence de la séquence IDEXX Signature dans l'environnement de travail indique une contamination par le contrôle positif (PC). Les laboratoires souhaitant surveiller la contamination par le contrôle positif (PC) peuvent détecter la séquence IDEXX Signature en utilisant le mix cible RealPCR PC Tracker DNA Mix et le RealPCR DNA MMx.</p>					
RealPCR PCR Grade Water	Translucide	2 x 1,0 ml	-25 à 8°C		NA
<p>[REF] 99-56350</p> <p>L'eau de qualité PCR est qualifiée pour être utilisée pour la transcription-PCR inverse (RT-PCR). Elle est utilisée pour la reconstitution des réactifs RealPCR. Elle est également utilisée en tant que Contrôle Négatif PCR pour chaque run. Ne pas déplacer les tubes d'eau PCR entre les espaces de travail PCR. La séparation des tubes d'eau est nécessaire afin d'éviter les risques de contamination.</p>					

Remarque: voir le tableau à la fin du mode d'emploi pour la description des symboles utilisés dans ce mode d'emploi et sur les étiquettes.

Matériel nécessaire mais non fourni

- Kit commercial d'extraction de l'ARN
 - Facultatif: centrifugeuse avec un rotor et des adaptateurs pour les plaques multipuits
 - Microcentrifugeuse pour les microtubes de 2 ml (capacité: 1500 – 3000 x g)
 - Équipement de protection individuel adéquat (ex: gants, blouse de laboratoire)
 - Embouts de pipettes nuclease-free avec filtre anti-aérosols
 - Microtubes stériles pour la préparation du mélange PCR
 - Pipettes (5 à 1 000 μ l) dédiées à la préparation du mélange PCR
 - Plaques PCR de 96 ou 384 puits et film adhésif optique/couvercles de plaque
 - Thermocycleur PCR en temps réel (Applied Biosystems[®] 7500, Applied Biosystems[®] 7500 Fast System (Standard et Fast Mode), Applied Biosystems[®] ViiA[®] 7, Applied Biosystems QuantStudio 5, Applied Biosystems QuantStudio[®] Flex, Agilent Mx3000P[®], Agilent Mx3005P[®], Agilent AriaMx, Bio-Rad CFX96 Touch[®], Bio Molecular Systems Mic qPCR Cycloer, QIAGEN[®] Rotor-Gene (Rotor 72 puits uniquement), Roche LightCycler[®] 480 ou équivalent).
- Remarque:** le thermocycleur Roche LC480 et son logiciel requièrent des paramétrages complémentaires. Le Service Technique IDEXX peut fournir l'assistance nécessaire pour l'utilisation des instruments mentionnés ci-dessus avec les réactifs IDEXX[®] RealPCR[®].

Pratiques de laboratoires et avertissements

- Ne pas utiliser les réactifs après la date d'expiration.
- La procédure complète doit être réalisée dans des conditions "nuclease-free".
- Porter des gants sans poudre lors de la manipulation des réactifs et des acides nucléiques.
- Pour éviter toute contamination croisée, utiliser des embouts de pipette nuclease-free avec filtre anti-aérosols pour tout pipetage. Séparer physiquement les espaces de travail pour l'extraction et la manipulation des acides nucléiques ainsi que pour la préparation et la réalisation du test PCR.

Reconstitution des composants déshydratés

Reconstituer le CSFV RNA Mix et le PC avec l'eau de qualité PCR au volume indiqué sur l'étiquette du composant. Laisser reposer à une température de 18 à 26°C pendant au moins 10 minutes; mélanger et passer brièvement à la microcentrifugeuse avant utilisation. Lorsque le CSFV RNA Mix et le PC sont reconstitués, aliquoter et congeler les solutions si besoin. Pour les composants congelés, décongeler à une température de 18 à 26°C pendant environ 15 à 30 minutes et mélanger délicatement, puis passer brièvement à la microcentrifugeuse (~1 500 – 3 000 x g).

Extraction de l'ARN

Le CSFV RNA Mix a été validé à l'aide des méthodes d'extraction commerciales indiquées ci-dessous. D'autres méthodes d'extraction ou procédures de lyse peuvent être utilisées dans la mesure où elles sont validées par le laboratoire.

- RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX)
- RealPCR DNA/RNA Spin Column Kit (IDEXX)
- NucleoSpin RNA Kit (Machery Nagel)
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)

Conserver l'ARN purifié à une température inférieure à $<-15^{\circ}\text{C}$ si le test n'est pas effectué immédiatement après extraction. Il est recommandé qu'un contrôle négatif d'extraction (échantillon blanc) soit inclus comme échantillon.

Mode opératoire

1 Préparation du mélange PCR.

- Mélanger le RNA MMx décongelé par inversions répétées ou en l'agitant délicatement.
- Le RNA MMx est une solution visqueuse; toujours la prélever lentement.
- Pipetter 10 μ l de CSFV RNA Mix et 10 μ l de RNA MMx pour chaque réaction.
- Lors de la préparation du mélange PCR, ajouter d'abord du CSFV RNA Mix dans le tube, puis ajouter le RNA MMx. Rincer plusieurs fois la pointe de la pipette du MMx par aspiration-refoulement.
- Retourner ou remuer délicatement la solution pour vérifier que les composants sont bien mélangés.
- Distribuer le mélange PCR lentement dans la plaque PCR.

Charger la plaque PCR dans les 20 min., sinon la conserver à 2 à 8°C pendant 4 heures maximum. Le mélange PCR peut être conservé à une température de -25 à -15°C pendant 2 semaines. Protéger de la lumière.

2 Distribuer 20 μ l de mélange PCR dans les puits requis de la plaque multipuits.

3 Distribuer 5 μ l d'échantillon d'ARN par puits. Le volume final de la réaction est de 25 μ l.

4 Distribuer 5 μ l de PC et 5 μ l de Contrôle Négatif PCR (eau de qualité PCR) pour chaque run.

5 Couvrir la plaque et la centrifuger brièvement si nécessaire pour éliminer les bulles d'air.

6 Programmer le thermocycleur à l'aide des paramètres standards IDEXX[®] RealPCR[®] DNA/RNA.

Paramètres pour le Reporter (marqueur) et le Quencher (extincteur)

<u>Cible</u>	<u>Reporter</u>	<u>Quencher</u>
CSFV	FAM [*]	BHQ [*] (aucun)
Contrôle Interne (ISC/IPC)	HEX [*] (VIC)	BHQ (aucun)
Référence passive	ROX [*]	NA

Programme standard des cycles de températures pour les réactifs IDEXX RealPCR DNA/RNA

	<u>Température</u>	<u>Durée</u>	<u>Cycles</u>
Transcription inverse (RT)	50°C	15 min.	1
Dénaturation	95°C	1 min.	1
Amplification [§]	95°C 60°C	15 s. 30 s.	45

[§]Vérifier que l'appareil est paramétré pour enregistrer la fluorescence après l'étape d'amplification à 60°C.

7 Analyser les données.

Lors du paramétrage du logiciel du thermocycleur, attribuer un identifiant unique à chaque cible ainsi qu'au contrôle interne. Par exemple, si les cibles A et B sont testées sur une même plaque, les puits A doivent être analysés séparément des puits B. Se reporter au manuel de l'utilisateur du thermocycleur sur la façon d'analyser les données. Utiliser la fonction "Auto Ct" pour déterminer la valeur seuil.

- Sur les thermocycleurs Agilent modèles Mx3000P[†] et Mx3005P[†], sélectionner la fonction "background-based threshold" pour l'analyse des résultats.
- Pour le thermocycleur QIAGEN[®] Rotor-Gene, ajuster manuellement le seuil au-dessus du bruit de fond dans la phase linéaire de l'amplification exponentielle. Il est préférable de le faire sur des courbes avec affichage logarithmique, et cet ajustement est requis pour chacun des « reporter » du mix cible.
- Pour les thermocycleurs Applied Biosystems[®]: dans certains cas, l'ajustement automatique du seuil ne permet pas d'obtenir des résultats satisfaisants. Un ajustement manuel du seuil est alors nécessaire pour déterminer les valeurs de Ct. Il est préférable de le faire sur des courbes avec affichage logarithmique, et cet ajustement est requis pour chacun des « reporter » du mix cible.

Critères de validité

	Valeur de Ct FAM [*]	Valeur de Ct HEX [*] (VIC)
Contrôle Positif	<38	<38
Contrôle Négatif PCR	Aucun signal	Aucun signal

8 Interprétation des résultats

Résultat de l'échantillon	Signal FAM	Signal HEX (VIC)	Autres caractéristiques
ARN CSFV détecté	Oui	Oui/Non	Une valeur de Ct positive et une courbe d'amplification caractéristique par rapport au Contrôle Négatif PCR. Une courbe d'amplification pour le contrôle interne dans le canal HEX (VIC) est attendue. Cependant, certains échantillons d'ARN fortement positifs au CSFV peuvent donner lieu à un résultat contrôle interne négatif. [†]
ARN CSFV non-détecté	Non	Oui	Courbe d'amplification dans le canal HEX (VIC) pour le contrôle interne.
Non valide [‡]	Non	Non	L'absence de courbe d'amplification dans les canaux FAM et HEX(VIC) indique un résultat non-valide.

[†]Le mix cible spécifique est optimisé pour la détection de l'ARN de CSFV; un échantillon d'ARN fortement positif peut empêcher la détection du contrôle interne.

[‡]Un résultat non valide peut indiquer un problème lors de l'ajout de l'échantillon, de l'extraction et/ou pendant la PCR. Il est recommandé de diluer l'ARN au 1/5 avec de l'eau de qualité PCR avant de refaire le test et d'inclure l'ARN non-dilué comme échantillon distinct. Si le résultat du test est toujours invalide, procéder à une nouvelle extraction.

Pour l'assistance technique:


IDEXX É.-U. Tél.: +1 800 548 9997 ou +1 207 556 4895

IDEXX Europe Tél.: +800 727 43399

Contactez votre responsable de secteur IDEXX, votre distributeur ou visitez notre site web: idexx.com/contactpd

Informations sur les brevets: idexx.com/patents

©2024 IDEXX Laboratories, Inc. Tous droits réservés.

-  Les composants fluorophores dans ce produit sont commercialisés sous licence de Biosearch Technologies, Inc. et protégés par les brevets américains et internationaux émis ou en application. La licence couvre les applications vétérinaires et humaines, limitées à la recherche et au développement et aux usages diagnostiques.

*IDEXX, RealPCR et Test With Confidence sont des marques commerciales ou des marques déposées d'IDEXX Laboratories ou de ses filiales aux États-Unis et/ou dans d'autres pays. Tous les autres logos, noms de produits et de sociétés sont des marques de commerce ou des marques déposées de leur détenteur respectif.



MENU



IMPRIMIR

Versão em Português

RealPCR* CSFV RNA Test

Para uso exclusivamente veterinário

Nome e uso pretendido

O RealPCR* CSFV RNA Test é usado para a detecção do RNA do vírus da peste suína clássica (CSFV) extraído de sangue (EDTA), soro, plasma, fluidos orais, amostras de swab ou tecido (baço, rim, linfonodo e amígdalas) de suínos, incluindo javalis. As amostras de tecido podem ser testadas em conjuntos de até 10 amostras, e no caso de sangue (EDTA), plasma e soro, em conjuntos de até 20 amostras. Os fluidos orais podem ser testados como uma amostra composta coletada em pocilgas com até 30 porcos. Os conjuntos contendo uma amostra única fraca (por exemplo, Ct > 32) podem gerar um resultado negativo devido ao efeito de diluição do conjunto.

Informações gerais

O CSFV é o agente causador da peste suína clássica (classical swine fever, CSF), uma doença hemorrágica altamente contagiosa que afeta porcos selvagens e domésticos. A CSF é caracterizada por taxas elevadas de morbidade e mortalidade, causando perdas econômicas sérias para a indústria de suínos, e por ser uma doença listada pela Organização Mundial de Saúde Animal (World Organization for Animal Health, OIE).

Os suínos infectados pelo CSFV podem espalhar uma alta quantidade de vírus antes de exibirem sinais clínicos da doença. Caso sobrevivam a uma infecção aguda ou subaguda, esses animais podem se tornar cronicamente infectados e excretar o vírus de modo intermitente ou contínuo até a morte. Nas porcas prenhas, o CSFV é capaz de atravessar a placenta e infectar os fetos, provocando abortos, mumificações fetais e suínos natimortos. Nos casos em que a infecção ocorre no meio da gestação (em torno de 50 a 70 dias), podem nascer leitões fracos ou persistentemente virêmicos. Esses leitões persistentemente infectados podem espalhar uma alta quantidade de vírus por vários meses.

O sistema IDEXX* RealPCR possui um formato modular específico por enfermidades onde as misturas dos alvos são emparelhados com um DNA padronizado ou mistura principal de RNA e um único pool de controle positivo. Os reagentes são embalados e vendidos separadamente para permitir a manipulação do reagente de forma flexível e individualmente.

O RealPCR CSFV RNA Mix (CSFV RNA Mix) contém primers e sondas para detecção do RNA do CSFV quando amplificado com o RealPCR RNA Master Mix (RNA MMx). O ensaio é uma reação da polimerase e transcriptase reversa em tubo único. O controle interno do teste é baseado na detecção de uma sequência de RNA endógena suína presente na amostra do hospedeiro, denominado controle interno da amostra (ISC) nesse protocolo. A detecção de RNA endógeno em amostras de suínos controla a adição, extração e amplificação da amostra. Os primers e a sonda para a detecção do controle interno da amostra estão incluídos no CSFV RNA Mix. Um controle positivo interno opcional, o RealPCR Internal Positive Control (IPC \geq v1.1), também está disponível e deve ser utilizado quando o RNA do hospedeiro endógeno estiver em níveis baixos, ou quando sua probabilidade de estar presente após a extração é pequena (como nas amostras ambientais). O IPC contém uma versão sintética do RNA de ISC suíno desejado, sendo, portanto, compatível com o CSFV RNA Mix. Consulte o folheto informativo do produto RealPCR Internal Positive Control (REF 99-56330) para orientação.

Materiais e armazenamento

Identificação/ Informações gerais	Cor da tampa	Quantidade	Armazenamento		Ciclos de congelamento/ descongelamento
		100 testes	No recebimento	Após a reconstituição	
RealPCR[®] CSFV RNA Mix (CSFV RNA Mix), desidratado	Amarelo	1 x 1,0 ml	-25 a 8°C	-25 a -15°C	≤6
<p>[REF] 99-56022</p> <p>Reconstituir com 1 ml de água grau PCR. Guarde o CSFV RNA Mix no escuro. A data de validade no frasco é válido tanto para a forma liofilizada ou reconstituída. A etiqueta do tubo de CSFV RNA Mix indica a versão PC que é compatível com o mix de alvo. Por exemplo, PC ≥ v1.4 significa que a mix de alvo pode ser utilizada com as versões maiores do que 1.4.</p>					
RealPCR RNA Master Mix (RNA MMx)	Preta	1 x 1,0 ml	-25 a -15°C (em longo prazo)	N/A	≤6
<p>[REF] 99-56280</p> <p>O concentrado de master mix inclui transcriptase reversa e hot-start polimerase para uso com o mixes de alvos IDEXX[®] RealPCR System. O RNA MMx é mais viscoso que a maioria dos master mix– consulte a seção Procedimento de teste para conhecer as recomendações de manuseio. Um corante de referência (ROX[®]) foi adicionado para normalizar imprecisões de volume. Proteja o RNA MMx da luz.</p>					
RealPCR Positive Control, desidratado (PC)	Azul	1 x 500 µl	-25 a 8°C	-25 a -15°C	≤6
<p>[REF] 99-56310</p> <p>Reconstituir com 500 µl em água grau PCR. O PC contém todos os alvos da IDEXX RealPCR e ISC (incluindo os alvos para CSFV) e é previsto para ser usado com todos os testes IDEXX RealPCR mix de alvo. A data de validade mostrada no frasco serve para a forma liofilizada ou reconstituída. O PC tem um número de versão (tal como v1.3). Quando novos mixes de alvo são desenvolvidos para a linha de produtos RealPCR, as sequências alvo são adicionadas ao PC e o número da versão PC aumenta (por exemplo, v1.3 seria atualizado para v1.4).</p> <p>O PC inclui a assinatura IDEXX (uma sequência única de oligonucleotídeos). A presença da Assinatura IDEXX no ambiente de trabalho, indica contaminação pelo PC. Para os laboratórios que desejam monitorar a contaminação pelo PC, a Assinatura IDEXX pode ser detectada usando o RealPCR PC Tracker DNA Mix e o RealPCR DNA MMx.</p>					
RealPCR PCR Grade Water	Limpido	2 x 1,0 ml	-25 a 8°C		N/A
<p>[REF] 99-56350</p> <p>A água de grau PCR é a qualificada para o uso com o PCR por transcriptase reversa (RT-PCR). Ela é usada para reconstituir os reagentes do RealPCR. Também é usada como controle negativo de PCR para cada teste realizado. Não transfira frascos de água de qualidade para PCR entre áreas de trabalho de PCR. São necessários frascos de água separados para cada área para evitar o risco de contaminação.</p>					

Nota: ver a tabela no final do inserte para uma descrição dos símbolos utilizados na inserte e nos rótulos.

Materiais necessários, mas não fornecidos

- Kit comercial de extração de RNA
- Opcional-Centrífuga com um rotor e adaptadores para placas multipoços
- Microcentrifuga para microtubos de 2 ml com capacidade de 1500 – 3000 x g
- Equipamento de proteção individual adequado (p. ex., luvas, jalecos)
- Ponteiras livres de nuclease e resistentes a aerossóis
- Microtubos estéreis para preparação do Mix PCR
- Pipetas com volumes de 5–1000 μ l; Pipetas dedicadas para preparação do Mix PCR
- Placas de PCR no formato 96 ou 384 e filme óptico/tampas de placas
- Instrumento de PCR em tempo real (Applied Biosystems[®] 7500, Applied Biosystems[®] 7500 Fast System (Standard e Fast Mode), Applied Biosystems[®] ViiA[®] 7, Applied Biosystems QuantStudio 5, Applied Biosystems QuantStudio[®] Flex, Agilent Mx3000P[®], Agilent Mx3005P[®], Agilent AriaMx, Bio-Rad CFX96 Touch[®], Bio Molecular Systems Mic qPCR Cyclers, QIAGEN[®] Rotor-Gene (apenas rotor de 72 poços), Roche LightCycler[®] 480 ou equivalente).

Nota- o instrumento Roche LC480 requer calibração adicional e ajustes no software. O suporte técnico da IDEXX[®] poderá fornecer orientações para o uso dos instrumentos mencionados acima com reagentes RealPCR[®].

Práticas laboratoriais e advertências

- Não use os reagentes após a data de validade.
- Todo o procedimento deve ser realizado sob condições isentas de nuclease.
- Use luvas sem talco ao trabalhar com os reagentes e ácidos nucleicos.
- Para evitar contaminação cruzada, utilize ponteiras livres de nuclease e resistentes a aerossóis para pipetar e separe fisicamente os locais de trabalho para a extração/manuseio de ácido nucleico, configuração da PCR e a PCR.

Reconstituição de componentes secos

Reconstitua o CSFV RNA Mix e o PC pipetando água de qualidade PCR para o volume indicado no rótulo do componente. Deixe em repouso entre 18 e 26°C por pelo menos 10 minutos; misture e microcentrifugue rapidamente antes do uso. Assim que o CSFV RNA Mix e o PC estiverem reconstituídos, divida adequadamente e congele as soluções. Ao manusear componentes congelados, descongele entre 18 e 26°C por 15 a 30 minutos, misture cuidadosamente e microcentrifugue rapidamente (\sim 1.500 – 3.000 x g).

Extração de RNA

O CSFV RNA Mix foi validado usando os métodos de extração comercial mostrados abaixo. Outros métodos de extração ou lise também podem ser usados, uma vez que sejam validados pelo laboratório.

- RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX)
- RealPCR DNA/RNA Spin Column Kit (IDEXX)
- NucleoSpin RNA Kit (Machery Nagel)
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)

Armazene o RNA purificado a $<-15^{\circ}\text{C}$ se o teste não for realizado imediatamente após a extração do RNA. Recomenda-se que um controle negativo de extração (amostra simulada) seja incluído como amostra.

Teste Procedimento

1 Preparação do Mix PCR.

- Misture o RNA MMx descongelado por inversão ou vórtice em baixa rotação de maneira suave.
- O RNA MMx é uma solução viscosa; sempre pipete lentamente.
- Para preparar a mistura de PCR adicione 10 μ l CSFV RNA Mix e 10 μ l do RNA MMx para cada reação.
- Ao preparar o PCR Mix, primeiro pipete CSFV RNA Mix no tubo e, em seguida, adicione o RNA MMx. Pipete algumas vezes para lavar a ponta de pipeta do MMx.
- Homogenize de forma cuidadosa usando o vórtice em baixa rotação a solução para garantir que os componentes estejam bem misturados.
- Pipetar a mistura de PCR lentamente na placa de PCR.

Coloque a placa de PCR por 20 minutos ou armazene entre 2 a 8°C por até 4 horas. O Mix PCR pode ser armazenado de -25°C a -15°C durante 2 semanas. Proteja da luz.

2 Pipetar 20 μ l do Mix de PCR para os poços necessários da placa com múltiplas cavidades.

3 Adicione 5 μ l de amostra de RNA a cada poço. O volume da reação final é de 25 μ l.

4 Adicione o PC (5 μ l) e o controle negativo de PCR (5 μ l de água grau PCR) para cada teste realizado.

5 Cubra a placa com a tampa. Gire cuidadosamente a placa, se necessário, para acomodar o conteúdo e remover bolhas de ar.

6 Configure o termociclador com o programa padrão de ciclagem da IDEXX[®] RealPCR[®] Padrão DNA/RNA.

Configurações para reporter e quencher

<u>Alvo</u>	<u>Reporter</u>	<u>Quencher</u>
CSFV	FAM [*]	BHQ [*] (nenhum)
Controle Interno (ISC/IPC)	HEX [*] (VIC)	BHQ (nenhum)
Referência passiva	ROX [*]	N/A

Programa Padrão de Ciclagem de DNA/RNA do RealPCR

	<u>Temperatura</u>	<u>Tempo</u>	<u>Ciclos</u>
Transcription Reversa (RT)	50°C	15 min.	1
Desnaturação	95°C	1 min.	1
Amplificação [§]	95°C	15 seg	45
	60°C	30 seg	

[§]Certifique-se de que o instrumento esteja configurado para registrar fluorescência após a etapa de amplificação de 60°C.

7 Análise os dados

Ao configurar o software do aparelho, atribuir um identificador único para cada alvo controle interno. Por Exemplo, quando o alvo A e B estão em uma única placa, os poços da cavidade A devem ser analisados independentemente das cavidades do B. Consulte o manual do usuário do instrumento específico para obter orientação sobre como analisar os dados. Para estabelecer o limiar de fluorescência (threshold), use a configuração Auto Ct (Auto threshold cycle - Ciclo de limiar automático).

- No Agilent Mx3000P e Mx3005P[†], certifique-se que esteja sendo usado para análise o método "background-based threshold".
- Para o instrumento QIAGEN[®] Rotor-Gene, ajuste manualmente a linha limiar acima do valor de fundo na fase linear de amplificação exponencial. A melhor forma de se proceder é por meio de gráficos de logarítmicos, e é necessário para cada relato da mistura alvo.
- Instrumentos da Applied Biosystems[™] – Em determinadas situações, a configuração automática do limite não produz resultados satisfatórios. Nessas situações, um ajuste manual do limite é necessário para determinar os valores de Ct. Isso é feito melhor em plotagens de exibição de log e deve ser repetido para cada repórter no mix de destino.

Crítérios de validade

	<u>FAM*</u> valor Ct	<u>HEX (VIC)</u> valor Ct
Controle de PCR Positivo	<38	<38
Controle de PCR negativo	Nenhum sinal	Nenhum sinal

8 Interpretação dos resultados

<u>Resultado da amostra</u>	<u>FAM (sinal)</u>	<u>HEX (VIC) sinal</u>	<u>Outras características</u>
RNA CSFV detectado	Sim	Sim/Não	O valor de Ct positivo e a característica da curva de amplificação em comparação com o controle negativo da PCR. É esperada uma curva de amplificação de controle interno no canal HEX(VIC); algumas amostras fortes positivas de RNA CSFV pode resultar em um resultado negativo de controle interno. [†]
RNA CSFV não detectado	Não	Sim	Curva de amplificação do controle interno no canal HEX (VIC).
Inválida [‡]	Não	Não	Ausência de uma curva de amplificação nos canais FAM e HEX (VIC) indicam um resultado inválido.

[†]O mix de reagentes de alvos é otimizado para a detecção de RNA para CSFV: uma amostra fortemente positiva com RNA alvo pode competir na detecção do controle interno.

[‡]Uma amostra inválida pode ser uma indicação de falha na adição da amostra, extração e/ou da PCR. Recomenda-se que o RNA seja diluído cinco vezes em água grau PCR e novamente testado; incluir o RNA não diluído como uma amostra. Se o teste ainda não validar uma nova extração é recomendada.

Para assistência técnica:


IDEXX EUA Tel: +1 800 548 9997 ou +1 207 556 4895

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Contate o representante local ou distribuidor IDEXX ou visite: idexx.com/contactlpd

Informações sobre patentes: idexx.com/patents

©2024 IDEXX Laboratories, Inc. Todos os direitos reservados.

-  Compostos corantes neste produto são vendidas sob licença da Biosearch Technologies, Inc. e protegidos por patentes pelos Estados Unidos e mundiais, já concedidas ou em aplicação. A licença abrange aplicações veterinárias e humanas, limitadas à pesquisa, desenvolvimento e ao uso diagnóstico.

*IDEXX, RealPCR e Test With Confidence são marcas comerciais ou marcas comerciais registradas da IDEXX Laboratories ou de suas afiliadas nos Estados Unidos e/ou em outros países. Todos os outros nomes de produtos e de empresas, assim como logotipos, são marcas ou marcas registradas de seus respectivos proprietários.



MENÚ



IMPRIMIR

Versión Española

RealPCR* CSFV RNA Test

Para uso veterinario exclusivo

Nombre y uso previsto

La prueba RealPCR* CSFV RNA Test se utiliza para la detección del ARN de virus de la peste porcina clásica (CSFV) extraído de sangre (EDTA), suero, plasma, fluidos orales, muestras de hisopos o tejidos (bazo, riñón, ganglios linfáticos y amígdalas) de porcino, incluyendo el jabalí. Las muestras de tejidos pueden analizarse en mezclas de hasta 10 muestras y la sangre (EDTA), el plasma y el suero pueden analizarse en mezclas de hasta 20 muestras. Los líquidos orales pueden analizarse como muestra compuesta tomada de pocilgas con hasta 30 cerdos. Las mezclas que contienen una muestra individual débil (por ejemplo, Ct > 32) pueden ofrecer un resultado negativo debido al efecto de dilución de la mezcla.

Información general

El CSFV es el agente causante de la fiebre porcina clásica (CSF), una enfermedad hemorrágica muy contagiosa que afecta a cerdos salvajes y domésticos. La CSF se caracteriza por tasas elevadas de morbilidad, que provocan graves pérdidas económicas en la industria porcina, y es una enfermedad incluida en el listado de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

Los cerdos infectados con CSFV pueden excretar una gran cantidad de virus antes de mostrar los signos clínicos de la enfermedad. Si los animales sobreviven a una infección aguda o subaguda, pueden infectarse de forma crónica y excretar el virus de forma intermitente o de forma continua hasta su muerte. En cerdas gestantes, el CSFV puede traspasar la placenta e infectar a los fetos, provocando abortos, momificaciones fetales y crías nacidas muertas. En las infecciones a mitad de gestación (~50–70 días de embarazo), pueden nacer lechones débiles o persistentemente virémicos. Estos lechones infectados persistentemente pueden excretar altos niveles de virus durante varios meses.

El sistema IDEXX* RealPCR es un formato modular en el que cada mezcla diana específica de una enfermedad se empareja con una mezcla maestra estandarizada para ADN o ARN y un único control positivo agrupado. Los reactivos se empaquetan de forma individual y se venden por separado para permitir flexibilidad en el manejo de los reactivos.

La mezcla RealPCR CSFV RNA Mix (CSFV RNA Mix) contiene cebadores y sondas para la detección del ARN del CSFV cuando se amplifica con RealPCR RNA Master Mix (RNA MMx). El ensayo es una reacción de la polimerasa con transcriptasa inversa en un tubo individual. El control interno del análisis se basa en la detección de una secuencia de ARN porcino endógeno presente en la muestra del hospedador, que se denomina control interno de la muestra (internal sample control, ISC) en este protocolo. La detección de ARN endógeno en las muestras porcinas controla la adición, extracción y amplificación de las muestras. En CSFV RNA Mix se incluyen cebadores y sondas para la detección del control interno de la muestra. También está disponible RealPCR Internal Positive Control (IPC \geq v1.1) y debe utilizarse cuando el ARN del hospedador endógeno se encuentre en niveles bajos o si la presencia de este sea poco probable después de la extracción (como en muestras ambientales). El IPC contiene una versión sintética de la diana de ARN del ISC porcino, por lo que es compatible con CSFV RNA Mix. Consultar el protocolo del producto de RealPCR Internal Positive Control ([REF 99-56330](#)) para obtener más información.

Materiales y almacenamiento

Identificación/ Información general	Color de la tapa	Cantidad	Almacenamiento		Ciclos de congelación/ descongelación
		100 pruebas	Al momento de recepción	Después de la reconstitución	
RealPCR[®] CSFV RNA Mix (CSFV RNA Mix), deshidratado	Amarillo	1 x 1,0 ml	-25 y 8°C	-25 y -15°C	≤6
<p>[REF] 99-56022</p> <p>Reconstituir hasta 1 ml en agua grado PCR. Almacenar la CSFV RNA Mix en un lugar oscuro. La fecha de vencimiento indicada en el vial es válida tanto para la forma en polvo como para la reconstituida. La etiqueta del tubo de CSFV RNA Mix indica qué versión del control positivo (PC) es compatible con esa mezcla diana. Por ejemplo, PC ≥ 1.4 significa que la mezcla diana puede ser utilizada con toda aquella versión superior o igual a la versión 1.4.</p>					
RealPCR RNA Master Mix (RNA MMx)	Negro	1 x 1,0 ml	-25 y -15°C (A largo plazo)	N/C	≤6
<p>[REF] 99-56280</p> <p>Master Mix concentrada que contiene transcriptasa reversa y polimerasa para el inicio en caliente para su uso con las mezclas diana del sistema IDEXX[®] RealPCR. La RNA MMx es más viscosa que la mayoría de las mezclas maestras. Consultar la sección del procedimiento de la prueba para obtener recomendaciones sobre la manipulación. Se ha agregado un tinte de referencia (ROX[®]) para normalizar las inexactitudes de volumen. Proteger de la luz la RNA MMx.</p>					
RealPCR Positive Control, deshidratado (PC)	Azul	1 x 500 µl	-25 y 8°C	-25 y -15°C	≤6
<p>[REF] 99-56310</p> <p>Reconstituir hasta 500 µl en agua grado PCR. El PC contiene todas las secuencias diana de IDEXX RealPCR e ISC (incluidas las secuencias para CSFV) y está diseñado para su uso con todas las mezclas diana IDEXX RealPCR. La fecha de vencimiento indicada en el vial es válida tanto para la forma en polvo como para la reconstituida. El PC lleva un número de versión (por ejemplo v1.3). Cuando se desarrollan nuevas mezclas diana, se añaden nuevas secuencias diana al PC y se incrementa el número de versión de éste (por ejemplo, v1.3 se actualizará a v1.4).</p> <p>El Control Positivo (PC) incluye la denominada IDEXX Signature (secuencia única de oligonucleótidos). La presencia de la IDEXX Signature en el área de trabajo indica contaminación por el PC. Para los laboratorios que deseen monitorizar si existe contaminación por el PC, la IDEXX Signature puede detectarse usando la mezcla diana RealPCR PC Tracker DNA Mix y la RealPCR DNA MMx.</p>					
RealPCR PCR Grade Water	Transparente	2 x 1,0 ml	-25 y 8°C		N/C
<p>[REF] 99-56350</p> <p>El agua grado PCR ha sido cualificada para su uso en transcripción inversa-PCR (RT-PCR). Se usa para la reconstitución de los reactivos RealPCR. También se usa como el control negativo de la PCR en cada prueba. No trasladar viales de agua grado PCR entre las áreas de trabajo de la PCR. Se necesitan viales de agua separados para cada área, a fin de evitar el riesgo de contaminación.</p>					

Nota: Ver tabla al final del protocolo para las explicaciones de los símbolos utilizados en este protocolo y en las etiquetas.

Materiales necesarios que no se incluyen

- Kit comercial de extracción de ARN
- Opcional: Centrífuga con un rotor y adaptadores para placas de pocillos múltiples
- Microcentrifuga para microtubos de 2 ml capaz de alcanzar 1500 – 3000 x g
- Equipo adecuado de protección personal (p. ej., guantes, bata de laboratorio)
- Puntas de pipetas resistentes a los aerosoles y libres de nucleasa
- Microtubos estériles para la preparación de la Mezcla PCR
- Pipetas (5–1000 μ l); destinadas a la preparación de la Mezcla PCR
- Placas para PCR de 96 o 384 pocillos y cubiertas de láminas o placas adhesivas ópticas
- Instrumento para PCR en tiempo real (Applied Biosystems[®] 7500, Applied Biosystems[®] 7500 Fast System (Standard y Fast Mode), Applied Biosystems[®] ViiA[®] 7, Applied Biosystems QuantStudio 5, Applied Biosystems QuantStudio[®] Flex, Agilent Mx3000P[®], Agilent Mx3005P[®], Agilent AriaMx, Bio-Rad CFX96 Touch[®], Bio Molecular Systems Mic qPCR Cyciler, QIAGEN[®] Rotor-Gene (solo para el rotor de 72 pocillos), Roche LightCycler[®] 480 o equivalente).

Nota: el aparato LC480 de Roche requiere calibración y ajustes adicionales del software.

El servicio técnico de IDEXX[®] puede proporcionar ayuda sobre la utilización del instrumento mencionado arriba con los reactivos RealPCR[®].

Prácticas y advertencias de laboratorio

- No usar los reactivos después de la fecha de vencimiento.
- Todo el procedimiento debe realizarse en condiciones libres de nucleasa.
- Utilizar guantes libres de polvo al trabajar con reactivos y ácidos nucleicos.
- Para evitar la contaminación cruzada, usar puntas de pipetas resistentes a los aerosoles y libres de nucleasa para todas las recolecciones y separar físicamente los lugares de trabajo para la extracción o el manejo de ácidos nucleicos, la preparación de la PCR y la PCR.

Reconstitución de los componentes en polvo

Reconstituir la CSFV RNA Mix y el Control Positivo pipeteando agua grado PCR hasta el volumen que se indica en la etiqueta del componente. Dejar reposar a una temperatura de entre 18 y 26°C durante, al menos, 10 minutos; mezclar y centrifugar brevemente antes de su uso. Una vez que se hayan reconstituido la CSFV RNA Mix y el PC, dividir en las alícuotas que correspondan y almacenar las soluciones congeladas. Al manejar componentes congelados, descongelar a una temperatura de entre 18 y 26°C durante, aproximadamente, de 15 a 30 minutos, mezclar suavemente después centrifugar brevemente (~1500 – 3000 \times g).

Extracción de ARN

La CSFV RNA Mix se ha validado mediante los métodos de extracción comerciales que se nombran a continuación. También podrán usarse otros métodos de extracción o lisis una vez que hayan sido validados por el laboratorio.

- RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX)
- RealPCR DNA/RNA Spin Column Kit (IDEXX)
- NucleoSpin RNA Kit (Machery Nagel)
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)

Almacenar el ARN purificado a $<-15^{\circ}\text{C}$ si la prueba no se realiza inmediatamente después de la extracción de ARN. Se recomienda incluir como muestra un control de extracción negativo (muestra simulada).

Procedimiento de la Prueba

1 Preparación de la mezcla PCR.

- Mezclar la RNA MMx descongelada mediante inversión o vortex suave.
- La RNA MMx es una solución viscosa; pipetear siempre lentamente.
- Para preparar la mezcla PCR añadir 10 μ l de CSFV RNA Mix y 10 μ l de RNA MMx para cada reacción.
- Cuando se prepare la Mezcla PCR, pipetear primero la CSFV RNA Mix en el tubo y después añadir la RNA MMx. Mover la pipeta hacia arriba y abajo varias veces para enjuagar la punta de la pipeta con MMx.
- Invertir o mezclar con un agitador vorticial suavemente para garantizar que los componentes se hayan mezclado bien.
- Añadir la mezcla PCR lentamente a la placa PCR.

Cargar la placa PCR en 20 minutos como máximo o guardarla a 2 y 8°C hasta un máximo de 4 horas. La Mezcla PCR puede almacenarse a una temperatura de -25 a -15°C durante 2 semanas. Proteger de la luz.

2 Añadir 20 μ l de la mezcla PCR en los pocillos requeridos de la placa multipocillo.

3 Añadir 5 μ l de ARN muestra en cada pocillo. El volumen de la reacción final es de 25 μ l.

4 Incluir el PC (5 μ l) y el control negativo de PCR (5 μ l de agua grado PCR) por cada prueba que se realice.

5 Cubrir la placa y hacer girar brevemente la placa, si es necesario, para que se asiente el contenido y eliminar las burbujas de aire.

6 Configurar el termociclador con las configuraciones estándar de IDEXX[®] RealPCR[®] y el programa de ciclos.

Parámetros para el indicador y el inhibidor

Diana	Indicador	Inhibidor
CSFV	FAM*	BHQ* (ninguno)
Control Interno (ISC/IPC)	HEX* (VIC)	BHQ (ninguno)
Referencia pasiva	ROX*	N/C

Programa estándar de Ciclos RealPCR DNA/RNA

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Transcripción Inversa (RT)	50°C	15 min.	1
Desnaturalización	95°C	1 min.	1
Amplificación [§]	95°C	15 s	45
	60°C	30 s	

[§]Asegurarse de que el instrumento se fije para medir la fluorescencia después del paso de amplificación de 60°C.

7 Analizar los datos

Cuando se configure el software del instrumento, asignar un identificador único a cada diana y control interno. Por ejemplo, cuando las dianas A y B están en una sola placa, los pocillos A deben ser analizados independientemente de los pocillos B. Consultar el manual del usuario del instrumento específico para obtener orientación sobre cómo analizar datos. Para establecer el valor umbral, usar el parámetro Auto Ct.

- En el Agilent Mx3000P[†] y en el Mx3005P[†] asegurarse de que se está utilizando para el análisis el método "background-based threshold".
- Para el instrumento QIAGEN[†] Rotor-Gene, ajustar de manera manual el umbral por encima del ruido de fondo en la fase lineal de la amplificación exponencial. Es preferible realizarlo en gráficas logarítmicas siendo necesario para cada marcador de la mezcla diana.
- Instrumentos Applied Biosystems[†] – En ciertas situaciones el parámetro de auto umbral no produce resultados satisfactorios. En estos casos, es necesario un ajuste manual del umbral para determinar los valores Ct. Como mejor se realiza es en el diagrama de distribución de datos y se debe repetir para cada indicador en la mezcla diana.

Criterios de validez

	Valor Ct de FAM [†]	Valor Ct de HEX [†] (VIC)
Control Positivo	<38	<38
Control Negativo PCR	Sin señal	Sin señal

8 Interpretación de los resultados

Resultado de las muestras	Señal FAM	Señal HEX (VIC)	Otras características
ARN de CSFV detectado	Sí	Sí/No	Un valor Ct positivo y una curva de amplificación característica en comparación con el control negativo PCR. Se espera una curva de amplificación del control interno en el canal de HEX (VIC); sin embargo, es posible que algunas muestras fuertemente positivas para ARN de CSFV tengan un resultado negativo para el control interno. [‡]
ARN de CSFV no detectado	No	Sí	Curva de amplificación en el canal de HEX (VIC).
Inválido [†]	No	No	La ausencia de una curva de amplificación en los canales FAM y HEX (VIC) indica un resultado inválido.

[†]Los reactivos de la mezcla diana se encuentran optimizados para detectar el ARN de CSFV; una muestra fuertemente positiva en ARN puede sobrepasar la detección del control interno.

[‡]Un resultado no válido puede indicar un problema al añadir la muestra, de extracción y/o durante el protocolo de PCR. Se recomienda diluir el ARN a 1/5 con agua de calidad PCR antes de volver a realizar la prueba e incluir una muestra de ARN no diluido como muestra. Si la prueba sigue resultando inválida se recomienda proceder a una nueva extracción.

Para asistencia técnica:


IDEXX EE.UU. Tel: +1 800 548 9997 o +1 207 556 4895

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Contacte al representante local o distribuidor IDEXX o visite: idexx.com/contactlpd

Información de patentes: idexx.com/patents

©2024 IDEXX Laboratories, Inc. Todos los derechos reservados.

-  Los compuestos colorantes de este producto se venden bajo licencia de Biosearch Technologies, Inc. y están protegidos por las patentes de Estados Unidos y mundiales bien ya concedidas o en proceso. La licencia cubre aplicaciones veterinarias y humanas, limitadas a la investigación y el desarrollo y al uso diagnóstico.

*IDEXX, RealPCR y Test With Confidence son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de IDEXX Laboratories o sus afiliadas en los Estados Unidos y/u otros países. Todos los demás logotipos y nombres de productos y compañías son marcas o marcas registradas de sus respectivos titulares.



MENU



STAMPA

Versione italiana

RealPCR* CSFV RNA Test

Solo per uso veterinario

Nome e uso previsto

Il RealPCR* CSFV RNA Test utilizzato per la rilevazione dell'RNA del virus della peste suina classica (Classical Swine Fever Virus, CSFV) estratto dal sangue con EDTA, dal siero, dal plasma, fluidi orali, da tamponi o tessuti di suini, inclusi i cinghiali (milza, reni, linfonodi e tonsille). I campioni possono essere analizzati in pool fino a 10 campioni di tessuti e fino a 20 campioni di sangue EDTA, plasma o siero. I fluidi orali possono essere testati come un campione composito prelevato da recinti per suini in cui sono presenti fino a 30 esemplari. I pool contenenti un singolo campione debole (ad esempio, Ct > 32) possono produrre un risultato negativo dovuto all'effetto di diluizione del pooling.

Informazioni generali

Il CSFV è l'agente eziologico della peste suina classica, una malattia emorragica altamente contagiosa che colpisce maiali selvatici e domestici. La CFS è caratterizzata da tassi di morbilità e di mortalità elevati che causano gravi perdite economiche nel settore suino ed è una malattia elencata dall'Organizzazione mondiale per la salute animale (OIE).

I suini infetti con CSFV possono propagare una grande quantità di virus prima di mostrare segni clinici della malattia. Se gli animali sopravvivono ad un'infezione acuta o sub-acuta, possono diventare infetti cronici ed espellere il virus in maniera intermittente o continua fino alla morte. Nelle scrofe gravide, il CSFV è in grado di attraversare la placenta ed infettare i feti, provocando aborti, mummificazioni dei feti e cuccioli nati morti. Nelle infezioni nel periodo intermedio di gestazione (~50–70 giorni di gravidanza), possono nascere maialini deboli o persistentemente viremici. Questi maialini persistentemente viremici sono in grado di diffondere un alto livello di virus per diversi mesi.

Il sistema IDEXX* RealPCR è un formato modulare in cui miscele bersaglio specifiche per patologia sono accoppiati a un mix DNA o RNA standardizzato e a un singolo controllo positivo combinato. I reagenti sono confezionati singolarmente e venduti separatamente per consentire una gestione flessibile dei reagenti.

Il RealPCR CSFV RNA Mix (CSFV RNA Mix) contiene primer e sonde per la rilevazione dell'RNA del CSFV quando viene amplificato tramite RealPCR RNA Master Mix (RNA MMx). Il saggio consiste in una reazione di trascrizione inversa seguita da polimerizzazione a catena in una singola provetta. Il controllo interno del test si basa sulla rilevazione di una sequenza di RNA suino endogeno presente nel campione ospite e viene indicato come controllo del campione interno (internal sample control, ISC) nel presente protocollo. La rilevazione di RNA endogeno nei campioni suini permette di controllare l'aggiunta, l'estrazione e l'amplificazione del campione. Primer e sonde per la rilevazione del controllo del campione interno sono compresi nel CSFV RNA Mix. È disponibile anche un controllo positivo interno facoltativo, il RealPCR Internal Positive Control (IPC \geq v1.1), e deve essere usato quando l'RNA ospite endogeno è presente a livelli bassi o quando la sua presenza dopo l'estrazione è improbabile (come nei campioni ambientali). L'IPC contiene una versione sintetica dell'RNA target dell'ISC suino ed è quindi compatibile con il CSFV RNA Mix. Per informazioni fare riferimento al foglio illustrativo del prodotto RealPCR Internal Positive Control (REFI 99-56330).

Materiali e conservazione

Identificazione/ Informazioni generali	Colore del tappo	Quantità	Conservazione		Cicli di congelamento/ scongelo
		100 prove	Al ricevimento	Dopo la ricostituzione	
RealPCR[®] CSFV RNA Mix (CSFV RNA Mix), disidratato [REF] 99-56022 Ricostituire a 1 ml in di acqua per PCR. Conservare il CSFV RNA Mix al buio. La data di scadenza sul flaconcino è valida sia per la forma liofilizzata che ricostituita. L'etichetta del flaconcino CSFV RNA Mix indica la versione PC di controllo positivo (PC) che è compatibile con la miscela bersaglio. Ad esempio, PC ≥ v1.4 significa che la miscela bersaglio può essere usata con PC v1.4 e tutte le versioni 1.4 o superiori.	Giallo	1 x 1,0 ml	-25 a 8°C	-25 a -15°C	≤6
RealPCR RNA Master Mix (RNA MMx) [REF] 99-56280 Master mix concentrato che include trascrittasi inversa e polimerasi hot-start destinate all'uso con la miscela bersaglio dell'RNA nel sistema IDEXX [®] RealPCR. Il RNA MMx è più viscoso della maggior parte dei master mix-vedere la sezione Procedura di del Test per le raccomandazioni di manipolazione. È stato aggiunto un colorante di riferimento (ROX [®]) per normalizzare le imprecisioni di volume. Proteggere il RNA MMx dalla luce.	Nero	1 x 1,0 ml	-25 a -15°C (Lungo termine)	N/D	≤6
RealPCR Positive Control, disidratato (PC) [REF] 99-56310 Ricostituire a 500 µl in acqua per PCR. Il PC contiene tutti i target IDEXX RealPCR e ISC (compreso il target per la CSFV) ed è destinato all'uso con tutte le miscele bersaglio IDEXX RealPCR. La data di scadenza sul flaconcino è valida sia per la forma liofilizzata che ricostituita. Il PC ha un numero di versione (ad es. v1.3). Quando sono messi a punto nuove miscele bersaglio per la linea di prodotti RealPCR, le sequenze bersaglio vengono aggiunte al PC e il numero di versione PC aumenta (ad es. v1.3 viene aggiornata a v1.4). Nel PC è inclusa la IDEXX Signature (una sequenza oligonucleotidica). La presenza della IDEXX Signature nell'ambiente di lavoro indica la contaminazione causata dal PC. Per i laboratori che vogliono monitorare la contaminazione dal PC, la IDEXX Signature può essere rilevata usando il RealPCR PC Tracker DNA Mix e il RealPCR DNA MMx.	Blu	1 x 500 µl	-25 a 8°C	-25 a -15°C	≤6
RealPCR PCR Grade Water [REF] 99-56350 L'acqua per PCR è qualificata per l'utilizzo della PCR retro trascrizionale (RT-PCR). Viene utilizzata per la ricostituzione dei reagenti RealPCR. È altresì utilizzata come controllo negativo PCR per ciascuna sessione di test. Non trasferire flaconcini di acqua per PCR tra le aree di lavoro PCR. Sono necessari flaconcini separati di acqua per ogni area per evitare il rischio di contaminazione.	Trasparente	2 x 1,0 ml	-25 a 8°C		N/D

Nota: Vedere la tabella alla fine dell'inserito per una descrizione dei simboli usati nell'inserito e nelle etichette.

Materiali necessari ma non in dotazione

- Kit di estrazione di RNA commerciale
- Opzionale – Centrifuga con un rotore e adattatori per piastre a pozzetti multipli
- Micro-centrifuga per microprovette da 2 ml in grado di raggiungere 1500 - 3000 x g
- Adeguati dispositivi di protezione individuale (ad es. guanti, camice da laboratorio)
- Puntali per pipette privi di nucleasi resistenti alla contaminazione da aerosol
- Microprovette sterili per la preparazione del mix PCR
- Pipette (5–1000 µl); pipette dedicate per la preparazione del mix PCR
- Piastre PCR in formato da 96 o 384 pozzetti con film adesivo ottico/coperchi
- Strumento PCR in tempo reale (Applied Biosystems* 7500, Applied Biosystems* 7500 Fast System (Standard e Fast Mode), Applied Biosystems* ViiA* 7, Applied Biosystems QuantStudio 5, Applied Biosystems QuantStudio* Flex, Agilent Mx3000P*, Agilent Mx3005P*, Agilent AriaMx, Bio-Rad CFX96 Touch*, Bio Molecular Systems Mic qPCR Cycloer, QIAGEN* Rotor-Gene (solo rotore da 72 pozzetti), Roche LightCycler* 480 o equivalente).



Nota- Lo strumento Roche LC480 richiede una calibrazione e impostazioni software aggiuntive. L'assistenza tecnica di IDEXX* può fornire indicazioni sull'utilizzo degli strumenti di cui sopra con reagenti RealPCR*.

Pratiche di laboratorio e avvertenze

- Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza.
- L'intera procedura deve essere eseguita in assenza di nucleasi.
- Indossare guanti senza polvere quando si lavora con i reagenti e acidi nucleici.
- Per evitare la contaminazione incrociata, utilizzare puntali per pipette privi di nucleasi e resistenti alla contaminazione da aerosol per qualsiasi pipettaggio, e separare fisicamente i luoghi di lavoro in cui si eseguono l'estrazione/la manipolazione degli acidi nucleici, la preparazione e realizzazione della PCR.

Ricostituzione dei componenti liofilizzati

Ricostituire il CSFV RNA Mix e il PC pipettando acqua per PCR al volume indicato sull'etichetta dei componenti. Lasciar riposare tra 18 e 26°C per almeno 10 minuti; mescolare e microcentrifugare brevemente prima dell'uso. Una volta che il mix di rilevazione e il controllo positivo sono ricostituiti, frazionare in misura appropriata e conservare le soluzioni congelate. Dovendo manipolare componenti congelati, scongelarli tra 18 e 26°C per circa 15 a 30 minuti, mescolare delicatamente e poi microcentrifugare brevemente (~1.500 – 3.000 x g).

Estrazione del RNA

Il CSFV RNA Mix è stato convalidato utilizzando i metodi di estrazione commerciali elencati di seguito. Possono essere utilizzati anche altri metodi di estrazione o di lisi una volta convalidati dal laboratorio.



- RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX)
- RealPCR DNA/RNA Spin Column Kit (IDEXX)
- NucleoSpin RNA Kit (Machery Nagel)
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)

Conservare il RNA purificato a <-15°C se il test non viene eseguito immediatamente dopo l'estrazione di RNA. Si raccomanda di includere come campione un controllo di estrazione negativo (mock sample).

Procedura del test

1 Preparazione della miscela PCR.

- Mescolare il RNA MMx scongelato per inversione o mediante movimenti circolari delicati.
- Il RNA MMx è una soluzione viscosa; pipettarla sempre lentamente.
- Per preparare la miscela PCR aggiungere 10 μ l di CSFV RNA Mix e 10 μ l di RNA MMx per ogni reazione.
- Al momento della preparazione della miscela PCR, pipettare prima la miscela CSFV RNA Mix nel flaconcino e poi aggiungere il RNA MMx. Pipettare su e giù per un paio di volte per sciacquare il puntale della pipetta prima MMx.
- Miscelare delicatamente la soluzione per assicurare che i componenti siano mescolati bene.
- Pipettare la miscela PCR lentamente nella piastra PCR.

Caricare la piastra PCR entro 20 minuti o conservarla fra 2 e 8°C per un massimo di 4 ore. La miscela PCR può essere conservata da -25 a -15°C fino a 2 settimane. Conservare al riparo dalla luce.

2 Pipettare 20 μ l della miscela PCR nei pozzetti richiesti della piastra a pozzetti multipli.

3 Aggiungere 5 μ l di RNA del campione a ciascun pozzetto. Il volume di reazione finale è di 25 μ l.

4 Includere il controllo positivo PC (5 μ l) e il controllo negativo PCR (5 μ l di acqua per PCR) per ciascuna sessione del test.

5 Coprire la piastra e ruotare brevemente la piastra, se necessario, per fare sedimentare il contenuto e rimuovere le bolle d'aria.

6 Impostare il termociclatore con l'IDEXX® RealPCR® Standard DNA/RNA Cycling Program.

Impostazioni per Reporter e Quencher

<u>Bersaglio</u>	<u>Reporter</u>	<u>Quencher</u>
CSFV	FAM*	BHQ* (nessuno)
Controllo Interno (ISC/IPC)	HEX* (VIC)	BHQ (nessuno)
Riferimento passivo	ROX*	N/D

RealPCR Standard DNA/RNA Cycling Program

	<u>Temperatura</u>	<u>Tempo/Durata</u>	<u>Cicli</u>
Trascrittasi inversa (RT)	50°C	15 min.	1
Denaturazione	95°C	1 min.	1
Amplificazione [§]	95°C	15 sec.	45
	60°C	30 sec.	

[§]Assicurarsi che lo strumento sia impostato per registrare la fluorescenza dopo la fase di amplificazione a 60°C.

7 Analisi dei dati

Al momento di impostare il software dello strumento, assegnare un identificatore unico ad ogni target e controllo interno. Per esempio, quando il target A e il target B sono sulla stessa piastra, i pozzetti A devono essere analizzati indipendentemente dai pozzetti B. Fare riferimento al manuale specifico dello strumento per i dettagli sull'analisi dei dati. Per impostare la soglia, utilizzare l'impostazione Auto Ct.

- Sull'Agilent Mx3000P* e Mx3005P* assicurarsi di utilizzare per l'analisi il metodo della fluorescenza con soglia basata sul valore di fondo.
- Per lo strumento QIAGEN* Rotor-Gene regolare la linea di soglia sopra il background nella fase lineare dell'amplificazione esponenziale. Questa operazione viene eseguita al meglio sul grafico logaritmico ed è necessaria per ogni riferimento del mix di destinazione.
- Strumenti Applied Biosystems* – In determinate situazioni l'impostazione della soglia automatica non produce risultati soddisfacenti. In queste situazioni, è necessaria una regolazione manuale della soglia per determinare i valori di Ct. Questa operazione viene eseguita al meglio sul grafico logaritmico ed è necessaria per ogni riferimento del mix di destinazione.

Criteria di validità

	Valore Ct FAM*	Valore Ct HEX* (VIC)
Controllo positivo	<38	<38
Controllo negativo PCR	Nessun segnale	Nessun segnale

8 Interpretazione dei risultati

Risultato campione	Segnale FAM	Segnale HEX (VIC)	Altre caratteristiche
RNA di CSFV rilevato	Si	Si/No	Un valore Ct positivo e una curva caratteristica di amplificazione rispetto al controllo negativo PCR. È prevista una curva di amplificazione del controllo interno nel canale HEX (VIC); tuttavia, alcuni campioni fortemente CSFV-positivi possono causare un risultato negativo per il controllo interno.†
RNA di CSFV non rilevato	No	Si	Curva di amplificazione nel canale controllo interno HEX (VIC).
Non valido‡	No	No	L'assenza di una curva di amplificazione nei canali FAM e HEX (VIC) indica un risultato invalido.

†I reagenti della miscela bersaglio e sono ottimizzati per la rilevazione di CSFV nel RNA. Un campione di RNA fortemente positivo può impedire la rilevazione del controllo interno.

‡Un campione non valido può essere un'indicazione di un problema durante l'aggiunta, l'estrazione e/o la PCR. Si raccomanda di diluire il RNA cinque volte in acqua per PCR e ripetere il test; includere il RNA non diluito come campione. Se il test non è ancora valido, si consiglia una nuova estrazione.

Per assistenza tecnica:


IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 o +1 207 556 4895

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Contattare il responsabile di zona o il distributore IDEXX o consultare il sito: idexx.com/contact/pd

Informazioni sui brevetti: idexx.com/patents

©2024 IDEXX Laboratories, Inc. Tutti i diritti riservati.

 I coloranti presenti in questo prodotto sono venduti su licenza di Biosearch Technologies, Inc. e sono protetti da brevetti statunitensi e mondiali o concessi o in corso di registrazione. La licenza copre le applicazioni veterinarie e umane, limitate alla ricerca, sviluppo e uso diagnostico.

*IDEXX, RealPCR e Test With Confidence sono marchi commerciali o registrati di IDEXX Laboratories, Inc. o dei suoi affiliati negli Stati Uniti e/o in altri Paesi. Tutti gli altri prodotti, nomi aziendali e loghi sono marchi di proprietà di, e/o registrati dei rispettivi titolari.



МЕНЮ



ПЕЧАТЬ

Русская версия

RealPCR* CSFV RNA Test

Только для применения в ветеринарии



Наименование и предназначение

Тест RealPCR* CSFV RNA Test используется для обнаружения РНК вируса классической чумы свиней (КЧС), экстрагируемой из цельной крови (ЭДТА), сыворотки крови, плазмы крови, жидкости ротовой полости, тканей органов (селезенка, почки, лимфатические узлы и миндалины) и смывов от домашних свиней и диких кабанов. Пробы можно объединять: до 10 проб тканей органов или до 20 проб крови с ЭДТА, плазмы и сыворотки крови. Жидкость ротовой полости можно тестировать в виде композитного образца, взятого из помещения, содержащего до 30 животных. Если в объединенной пробе имеется один образец с низкой концентрацией (например, Ct > 32), то она может дать отрицательный результат вследствие эффекта разбавления.

Общая информация

Вирус КЧС является возбудителем классической чумы свиней (КЧС), высококонтагиозной геморрагической болезни, поражающей диких и домашних свиней. КЧС характеризуется высокой заболеваемостью и смертностью, что приводит к серьезным экономическим потерям в свиноводстве; она включена Всемирной организацией по охране здоровья животных (Международным эпизоотическим бюро, МЭБ) в список заболеваний, подлежащих регистрации.

Свины, инфицированные вирусом КЧС, могут выделять большое количество вируса в окружающую среду прежде, чем у них проявятся клинические признаки болезни. Животные, выжившие после острой или подострой инфекции, могут остаться хронически инфицированными и выделять вирус периодически или непрерывно до самой смерти. У беременных свиноматок вирус КЧС способен проникать сквозь плаценту и заражать плод, вызывая аборт, мумификацию плодов и мертворождение. При заражении свиноматки в период беременности (~50-70 дней беременности), на свет могут появиться слабые или персистентно инфицированные поросята. Эти персистентно инфицированные поросята могут в течение нескольких месяцев выделять вирус в больших количествах.

Тест-система IDEXX* RealPCR имеет модульный формат, в котором детекционная смесь, специфичная к данному заболеванию, сочетается со стандартизированной реакционной смесью ДНК или РНК (мастер-миксом), а также универсальным Положительным контролем. Реагенты имеют индивидуальную упаковку и продаются отдельно, что позволяет использовать их в любой комплектации.

Набор RealPCR CSFV RNA Mix (CSFV RNA Mix) содержит праймеры и зонды для обнаружения РНК вируса КЧС в процессе амплификации с помощью основного набора для выделения РНК – RealPCR RNA Master Mix (RNA MMx). Тест представляет собой одноступенчатую полимеразно цепную реакцию с обратной транскрипцией. Внутренний контроль теста основан на обнаружении эндогенной последовательности РНК свиньи, присутствующей в пробе хозяина, и в данном протоколе называется внутренним контрольным образцом (ISC). Обнаружение эндогенной РНК в пробах свиней обеспечивает контроль добавления, экстракции и амплификации проб. В наборе CSFV RNA Mix имеются праймеры и зонды для осуществления внутреннего контроля пробы. Также отдельно поставляется внутренний положительный контроль RealPCR Internal Positive Control (IPC ≥ v1.1), который должен использоваться, когда эндогенная РНК хозяина содержится в низких концентрациях или может вообще отсутствовать после экстракции (например при анализе проб из местообитания). IPC содержит синтетическую версию ISC – РНК свиньи, и поэтому совместим с набором CSFV RNA Mix. Для получения инструкций по применению набора RealPCR Internal Positive Control (REF 99-56330) см. листок-вкладыш к набору.


Материалы и условия хранения

Идентификация/ Общая информация	Цвет крышки	Количество	Хранение		Циклы замораживания/ размораживания
		100 тестов	При получении	После разбавления	
RealPCR[®] CSFV RNA Mix (CSFV RNA Mix), сухой	желтый	1 x 1,0 мл	-25 до 8°C	-25 до -15°C	≤6
<p>[REF] 99-56022</p> <p>Восстановите до 1 мл, используя воду, для ПЦР. Храните CSFV RNA Mix в темном месте. Срок годности на флаконе действителен как для сухой, так и восстановленной смеси. На этикетке пробирки с CSFV RNA Mix указана версия Положительного Контроля (PC), совместимого с этой Детекционной смесью. Например, PC ≥ v1.4 значит, что Детекционную смесь можно использовать с PC версии 1.4 и выше.</p>					
RealPCR RNA Master Mix (RNA MMx)	черный	1 x 1,0 мл	-25 до -15°C (длительное)	Не применимо	≤6
<p>[REF] 99-56280</p> <p>Концентрированный Мастер-Микс, включающий реверс-транскриптазу и hot-start полимеразу для обратной транскрипции, используется с РНК-детекционными смесями в системе IDEXX RealPCR. RNA MMx более вязкий, чем большинство мастер-миксов - рекомендации по работе с реагентом указаны в Процедурае Анализа. Добавлена референсная краска (ROX) для нормализации объемной погрешности. Защитите RNA MMx от света.</p>					
RealPCR Positive Control, сухой (PC)	Синий	1 x 500 мкл	-25 до 8°C	-25 до -15°C	≤6
<p>[REF] 99-56310</p> <p>Восстановите до 500 мкл, используя воду для ПЦР. PC содержит все IDEXX RealPCR и ISC мишени (включая мишени для CSFV) и подходит для использования со всеми детекционными смесями IDEXX RealPCR. Срок годности, указанный на ёмкости, действителен как для сухой, так и для восстановленной формы. PC имеет номер версии (например v1.3). Когда в линейке RealPCR появляется новая детекционная смесь, в состав PC добавляются новые последовательности-мишени и PC приобретает новый, более высокий номер версии (например v1.3 становится v1.4).</p> <p>Положительный Контроль включает в себя IDEXX Signature (уникальную последовательность олигонуклеотидов). Присутствие IDEXX Signature в лабораторной среде указывает на ее загрязнение Положительным Контролем. Лаборатории, желающие отслеживать контаминацию Положительным Контролем, могут определять IDEXX Signature при использовании RealPCR PC Tracker DNA Mix и RealPCR DNA MMx.</p>					
RealPCR PCR Grade Water	Прозрачная	2 x 1,0 мл	-25 до 8°C		Не применимо
<p>[REF] 99-56350</p> <p>Вода, пригодная для ПЦР, отвечает требованиям к использованию для ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR). Она используется для разведения RealPCR реагентов. Она используется для разбавления Детекционных смесей и Положительного контроля RealPCR. Она также применяется для каждого цикла ПЦР как Отрицательный контроль. Не переносите флаконы с водой из одной рабочей зоны в другую. Для избегания контаминации следует использовать разные флаконы с водой для разных зон.</p>					

ПРИМЕЧАНИЕ: см. таблицу на последней странице с описаниями международных символов, используемых в инструкции и на этикетках.

Необходимые материалы, не входящие в набор

- Коммерческий набор для экстракции РНК
- Факультативно—Центрифуга с ротором и адаптерами для многолуночных планшет.
- Микроцентрифуга для микропробирок по 2 мл для использования при 1500 – 3000 x g
- Необходимые средства личной защиты (такие, как перчатки, халат и пр.).
- Наконечники без нуклеазы, гидрофобные.
- Стерильные микропробирки для приготовления ПЦР-смеси.
- Дозаторы (5–1000 мкл); специально выделенные для работы с ПЦР-смесью.
- 96- или 384-луночный ПЦР-планшет и плёнка для заклеивания планшета/крышка.

-  Анализатор Real-time PCR (Applied Biosystems` 7500, Applied Biosystems` 7500 Fast System (Standard и Fast Mode), Applied Biosystems` ViiA` 7, Applied Biosystems QuantStudio 5, Applied Biosystems QuantStudio` Flex, Agilent Mx3000P`, Agilent Mx3005P`, Agilent AriaMx, Bio-Rad CFX96 Touch`, Bio Molecular Systems Mic qPCR Cycler, QIAGEN` Rotor-Gene (Только 72-луночный ротор), Roche LightCycler` 480 или эквивалентные).

Примечание: инструмент Roche LC480 требует дополнительных калибровочных и программных настроек. Техническая поддержка IDEXX` может предоставить руководство для использования этого инструмента с реагентами RealPCR`.

Меры предосторожности и правила лабораторной работы


- Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
- Вся работа должна проводиться в свободных от нуклеазы условиях.
- При работе с реагентами и нуклеиновыми кислотами используйте перчатки без талька.
- Чтобы избежать контаминацию, используйте одноразовые наконечники без нуклеазы и с антиаэрозольным покрытием, а так же разделите зоны для экстракции, подготовки к ПЦР и проведения ПЦР.

Восстановление Сухих Реагентов

Для восстановления Детекционной смеси CSFV RNA Mix и Положительного Контроля внесите Воду для ПЦР до указанного на ёмкости с реагентом объёма. Оставьте при 18 до 26°C минимум на 10 минут; перед применением перемешайте и коротко центрифугируйте. После восстановления Детекционной Смеси и Положительного Контроля разделите их на соответствующие аликвоты и храните в замороженном виде. Работая с замороженными реагентами, сначала оставьте их при 18 до 26°C примерно на 15 до 30 минут, затем аккуратно перемешайте и коротко центрифугируйте (~1,500 – 3,000 x g).

Пробоподготовка

CSFV RNA Mix была валидированна с использованием коммерческих наборов для экстракции, указанных ниже. Другие методы экстракции или лизиса могут быть использованны после внутрилабораторной валидации.

-  RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX)
- RealPCR DNA/RNA Spin Column Kit (IDEXX)
- NucleoSpin RNA Kit (Machery Nagel)
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)

Если анализ проводится не сразу же после экстракции, очищенную РНК следует хранить при температуре <-15°C. Отрицательный контроль экстракции рекомендуется исследовать как образец (ложный образец).

Процедура анализа

1 Приготовление ПЦР-микса.

- Перемешайте оттаявший мастер микс RNA MMx переворачиванием или осторожно на вортексе.
- Раствор RNA MMx весьма вязкий; всегда пипетируйте его медленно.
- Для подготовки ПЦР-микса добавьте 10 мкл детекционного раствора CSFV RNA Mix и 10 мкл мастер микса RNA MMx для каждой реакции.
- При приготовлении ПЦР-микса сначала вносите в пробирку детекционный раствор CSFV RNA Mix, а затем добавляйте мастер микс RNA MMx. Несколько раз пипетируйте вверх и вниз, чтобы смыть мастер микс MMx с наконечника.
- Аккуратно перемешайте на вортексе. Убедитесь, что компоненты тщательно перемешаны.
- Медленно внесите ПЦР-микс на планшет для ПЦР.

Загрузите планшет в блок ПЦР для проведения теста в течение следующих 20 минут или храните его до исследования при температуре 2 до 8°C до 4 часов. ПЦР-смесь можно хранить при температуре от -25 до -15°C до 2 недель, в защищенном от света месте.

2 Внесите по 20 мкл ПЦР-микса в нужное количество лунок на планшете.

3 Добавьте по 5 мкл образца РНК в лунки. Конечный объем реакционной смеси составляет 25 мкл.

4 В каждый анализ включайте положительный контроль (5 мкл) и отрицательный контроль (5 мкл Воды для ПЦР).

5 Накройте/заклейте планшет и, при необходимости, коротко центрифугируйте, чтобы осадить содержимое и избавиться от пузырьков.

6 Запрограммируйте амплификатор в соответствии со Стандартной ДНК/РНК Программой IDEXX® RealPCR®.

Настройки для Reporter и Quencher

<u>Цель исследования</u>	<u>Reporter</u>	<u>Quencher</u>
CSFV	FAM*	BHQ* (нет)
Внутренний Контроль (ISC/IPC)	HEX* (VIC)	BHQ (нет)
Пассивный Референтный канал	ROX*	Не применимо

Стандартная ДНК/РНК Программа RealPCR

	<u>Температура</u>	<u>Время</u>	<u>Циклы</u>
Обратная транскрипция (RT)	50°C	15 мин.	1
Денатурация	95°C	1 мин.	1
Амплификация [§]	95°C 60°C	15 сек. 30 сек.	45

[§]Убедитесь, что термоциклер настроен на считывание флюоресценции при 60°C во время амплификации.

7 Проведите анализ данных

При настройке программного обеспечения аппарата, присвойте уникальный идентификатор для каждой цели и внутреннего контроля. Например, когда тесты А и В проводятся на одном планшете, то лунки тест А должны быть проанализированы независимо от лунок теста В. Обратитесь к руководству по эксплуатации конкретного инструмента для получения сведений о том, как анализировать данные. Обратитесь к руководству по использованию соответствующего прибора для получения рекомендаций по анализу данных. Для установления порогового значения используйте настройку Auto Ct.

- При работе с системами компании Agilent Mx3000P^{*} и Mx3005P^{*} удостоверьтесь, что для анализа используется метод фоновой пороговой флуоресценции.
- Для инструмента QIAGEN^{*} Rotor-Gene вручную установите пороговое значение выше фона в линейной фазе экспоненциальной амплификации. Это лучше всего делать на графиках во время их просмотра и необходимо производить для канала, используемого для детекционного раствора.
- Инструменты Applied Biosystems^{*} – В некоторых ситуациях автоматически установленное пороговое значение не позволяет получать удовлетворительные результаты. В таких ситуациях для определения величины Ct пороговое значение необходимо установить вручную. Это лучше всего сделать при просмотре графиков и необходимо повторить для каждого репортера в детекционном растворе.

Критерии достоверности

	<u>FAM*</u> <u>Ct value</u>	<u>HEX* (VIC)</u> <u>Ct value</u>
Положительный Контроль	<38	<38
Отрицательный Контроль	Нет сигнала	Нет сигнала

8 Интерпретация результатов

<u>Результат анализа</u> <u>образца</u>	<u>Сигнал</u> <u>FAM</u>	<u>Сигнал</u> <u>HEX (VIC)</u>	<u>Другие характеристики</u>
CSFV–Положительный	Да	Да/Нет	Положительное значение Ct и характерная кривая амплификации по сравнению с Отрицательным конт. ПЦР. Кривая амплификации для Внутреннего контрольного образца ожидается в канале HEX (VIC); однако для некоторых резко положительных по CSFV проб может отмечаться отрицательный результат для Внутреннего контроля. [†]
CSFV–Отрицательный	Нет	Да	Кривая амплификации по каналу Внутреннего контроля HEX (VIC).
Недействительный [‡]	Нет	Нет	Отсутствие кривой амплификации в каналах FAM, и HEX (VIC) указывает на недействительный результат.

[†]Детекционный раствор оптимизирован для обнаружения РНК возбудителя КЧС; выражено положительная проба может конкурировать с внутренним контрольным образцом (ISC) и привести в его отношении к отрицательному результату.

[‡]Недействительный результат анализа образца может указывать на неправильное добавление, экстракцию образца и/или ошибки в проведении ПЦР. Рекомендуется пятикратное разведение РНК в воде, пригодной для ПЦР, и проведение повторного тестирования; также включите образец неразведенной РНК. Если тест по-прежнему недействителен, рекомендуется проведение новой экстракции.

Для получения технической помощи:


IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 or +1 207 556 4895

IDEXX Europe Tel: +800 727 43399

Обратитесь к Региональному менеджеру IDEXX или дистрибьютору, или посетите наш веб-сайт idexx.com/contactlpd

Информация о патенте: idexx.com/patents

©2024 IDEXX Laboratories, Inc. Все права защищены.

-  Состав красителя в этом продукте продается по лицензии Biosearch Technologies, Inc. и защищен американскими и мировыми патентами, которые имеются в наличии, либо в процессе получения. Лицензия распространяется на применение в ветеринарии и в человеческой медицине, ограниченное использованием в исследованиях и разработках и а так же в диагностике.

*IDEXX, RealPCR and Test With Confidence являются торговыми марками или зарегистрированными торговыми марками IDEXX Laboratories, Inc. или ее филиалов в США и/или других странах. Все остальные названия продуктов и компаний, а также логотипы являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками соответствующих владельцев.



MENU



PRINT

Wersja polska

RealPCR* CSFV RNA Test

Wyłącznie do użytku weterynaryjnego

Nazwa i przeznaczenie

Test RealPCR* CSFV RNA Test służy do wykrywania RNA wirusa klasycznego pomoru świń (CSFV) wyizolowanego z pełnej krwi pobranej na EDTA, surowicy, osocza, płynu z jamy gębowej (oral fluid), wymazów oraz tkanek (śledziony, nerek, węzłów chłonnych i migdałków) pochodzących od świń, w tym dzików. Próbki tkanek można badać w pulach zawierających maksymalnie do 10 sztuk, a próbki krwi (EDTA), osocza i surowicy można badać w pulach do 20 sztuk. Próbki płynu z jamy gębowej można badać jako próby zbiorcze z kojców, w których znajduje się maksymalnie 30 świń. Pule zawierające pojedynczą próbkę słabo dodatnią (np.: o Ct > 32) mogą uzyskać wynik ujemny wskutek efektu rozcieńczenia próbki w puli.

Informacje ogólne

Wirus klasycznego pomoru świń jest czynnikiem chorobotwórczym klasycznego pomoru świń (CSF) – wysoce zakaźnej choroby krwotocznej świń dzikich i domowych. CSF charakteryzuje się wysokimi wskaźnikami zachorowalności i śmiertelności, powoduje poważne straty gospodarcze w hodowli świń i jest chorobą znajdującą się na liście Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE).

Świnie zarażone CSFV mogą być źródłem rozprzestrzeniania dużej ilości wirusa, zanim zaczną wykazywać kliniczne objawy choroby. Jeżeli zwierzęta przeżyją ostre albo pod-ostre zakażenie, zakażenie może przyjąć postać przewlekłą, a zwierzęta mogą wydalac wirusa okresowo lub w sposób ciągły aż do śmierci. U prośnych loch CSFV może przedostać się przez łożysko i zakazić płody, wywołując poronienia, mumifikację płodów lub rodzenie martwych płodów. W przypadku zakażenia w połowie ciąży (~50–70 dzień ciąży) prosięta mogą urodzić się słabe albo z trwałą wiremą. Te przewlekłe zakażone prosięta w przeciągu kilku miesięcy mogą rozprzestrzenić dużą ilość.

System testowy IDEXX* RealPCR ma charakter modułowy, w którym specyficzne dla danej jednostki chorobowej mieszaniny służące do wykrycia wirusa (target mix) łączą się ze standaryzowanymi mieszaninami DNA lub RNA (master mix) oraz pojedynczą kontrolą dodatnią testu. Poszczególne odczynniki są pakowane indywidualnie oraz sprzedawane oddzielnie, aby umożliwić wygodne i ekonomiczne posługiwanie się nimi w laboratorium.

Mieszanina detekcyjna RealPCR CSFV RNA Mix (CSFV RNA Mix) zawiera startery i sondy służące do wykrywania RNA CSFV powielanego z wykorzystaniem mieszaniny RealPCR RNA Master Mix (RNA MMX). Test jest reakcją odwrotnej transkryptazy i polimerazy przebiegających w pojedynczej próbce. Wewnętrzna kontrola testu oparta jest na wykrywaniu endogennej sekwencji RNA świni w próbce pobranej od gospodarza i na potrzeby tego protokołu nazwana została wewnętrzną kontrolą próbki (ISC). Wykrycie endogennego RNA w badanej próbce weryfikuje etap dodania próbki do mieszaniny reakcyjnej, etap ekstrakcji oraz samej amplifikacji. Startery oraz sonda wykrywające wewnętrzną kontrolę próbki zawarte są w zestawie w mieszaninie CSFV RNA Mix. Dostępna jest także opcjonalna wewnętrzna kontrola dodatnia RealPCR Internal Positive Control (IPC \geq v1.1). Należy używać jej, jeśli stężenia endogennego RNA gospodarza są niskie lub jeśli jego występowanie po ekstrakcji jest mało prawdopodobne (jak np.: w próbce środowiskowej). IPC zawiera syntetyczną wersję ISC - świńskiej genomowej sekwencji RNA i dzięki temu jest zgodna z mieszaniną detekcyjną CSFV RNA Mix. Szczegółowe informacje znajdziesz w instrukcji wewnętrznej kontroli dodatniej RealPCR Internal Positive Control ([REFI 99-56330](#)).

Odczynniki i warunki ich przechowywania

Odczynnik/ informacje ogólne	Kolor nakrętki	Ilość	Przechowywanie		Liczba cykli zamrażania/ rozmrężania
		100 testów	Po otrzymaniu zestawu	Odczynnik po rekonstytucji	
RealPCR[®] CSFV RNA Mix (CSFV RNA Mix), Liofilizowana	Żółty	1 x 1,0 ml	-25 do 8°C	-25 do -15°C	≤6
<p>[REF] 99-56022</p> <p>Rozpuść w 1 ml wody do testów- PCR Grade Water. Mieszaninę CSFV RNA Mix należy przechowywać bez dostępu światła. Data ważności na folcie dotyczy zarówno liofilizatu jak i formy rozpuszczonej. Na etykiecie folki z mieszaniną detekcyjną CSFV RNA Mix podano wersję kontroli dodatniej PC z którą odczynnik może być używany. Np. PC ≥ v1.4 oznacza, że mieszaniny detekcyjnej można używać z kontrolą dodatnią w wersji PC 1.4 lub wyższej.</p>					
RealPCR RNA Master Mix (RNA MMx)	Czarny	1 x 1,0 ml	-25 do -15°C (długoterminowo)	Nie dotyczy	≤6
<p>[REF] 99-56280</p> <p>Stężona mieszanina master mix zawierająca odwrotną transkryptazę i polimerazę typu hot-start do stosowania razem z mieszaninami detekcyjnymi RNA w systemie IDEXX[®] RealPCR. Mieszanina Master Mix RNA jest bardziej lepka niż większość mieszanin tego typu – proszę zapoznać się z opisem wykonania testu, aby stosować ten odczynnik właściwie. Barwnik referencyjny (ROX[®]) dodany do odczynnika służy normalizacji objętości pobieranych pipetą. Mieszaninę RNA MMx należy chronić przed światłem.</p>					
RealPCR Positive Control, Liofilizowana (PC)	Niebieski	1 x 500 µl	-25 do 8°C	-25 do -15°C	≤6
<p>[REF] 99-56310</p> <p>Rozpuść w 500 µl wody do testów- PCR Grade Water. Odczynnik PC zawiera kontrole dodatnie dla wszystkich kierunków badawczych testów IDEXX RealPCR oraz ich wewnętrznych kontroli ISC (w tym również dla testu w kierunku CSFV) i jest przeznaczony do stosowania ze wszystkimi mieszaninami detekcyjnymi IDEXX RealPCR. Data ważności na folcie dotyczy zarówno liofilizatu jak i formy rozpuszczonej. Odczynnik PC ma numer wersji (np. v1.3). Wprowadzając nowy test w systemie RealPCR, producent wprowadza do Kontroli Dodatniej sekwencję dla danego kierunku badawczego, a numer wersji Kontroli Dodatniej wzrasta (na przykład dotychczasowy numer wersji v1.3 zostaje zmieniony na 1.4).</p> <p>Kontrola dodatnia PC zawiera sekwencję znacznikową IDEXX Signature (unikalną sekwencję oligonukleotydów). Wykrycie w badanej próbce pobranej z przestrzeni laboratorium obecności sekwencji znacznikowej IDEXX Signature wskazuje na kontaminację środowiska kontrolą dodatnią PC. Laboratoria, które chcą monitorować kontaminację przestrzeni laboratorium kontrolą dodatnią PC mogą wykryć obecność sekwencji znacznikowej IDEXX Signature używając mieszaniny wykrywającej RealPCR PC Tracker DNA Mix oraz mieszaniny master mix RealPCR DNA MMx.</p>					
RealPCR PCR Grade Water	Bezbarwny	2 x 1,0 ml	-25 do 8°C		Nie dotyczy
<p>[REF] 99-56350</p> <p>Woda do testów PCR przeznaczona jest do stosowania w testach odwrotnej transkrypcji-PCR (RT-PCR). Służy do rozpuszczania odczynników stosowanych w reakcjach RealPCR. Stosowana jest także jako kontrola ujemna PCR w każdym badaniu. Nie należy przenosić tego odczynnika między strefami roboczymi laboratorium PCR (strefa przygotowywania mieszaniny reakcyjnej, izolacji, wykonywania testu PCR etc.). Aby uniknąć ryzyka kontaminacji, w każdej strefie powinna znajdować się oddzielna, dedykowana folka wody do testów PCR.</p>					

Uwaga: W końcowej części niniejszej instrukcji znajduje się tabela, w której opisano symbole użyte w instrukcji wykonania oraz na etykietach odczynników.

Materiały niezbędne do wykonania badania, ale niedostępne w zestawie diagnostycznym

- Komercyjny zestaw do ekstrakcji RNA
- Opcjonalnie: wirówka z rotorem i adapterami na mikroplastyki
- Mikrowirówka na próbki o pojemności 2 ml osiągnąca przeciążenia 1500 – 3000xg
- Odpowiednie ubranie ochronne (np.: rękawiczki bezpudrowe, fartuch)
- Końcówki do pipet z filtrami, wolne od nukleaz
- Jałowe mikropróbki do przygotowywania mieszanin reakcyjnych do testu PCR
- Pipety o pojemnościach w zakresie 5 – 1000 μ l; pipety przeznaczone wyłącznie do przygotowywania mieszaniny reakcyjnej PCR
- 96- lub 384-dołkowe płytki do PCR oraz folia do zaklejania lub pokrywki do płytek
- Termocyklery do testu real-time PCR (Applied Biosystems[®] 7500, Applied Biosystems[®] 7500 Fast System (Standard oraz Fast Mode), Applied Biosystems[®] ViiA[®] 7, Applied Biosystems QuantStudio 5, Applied Biosystems QuantStudio[®] Flex, Agilent Mx3000P[®], Agilent Mx3005P[®], Agilent AriaMx, Bio-Rad CFX96 Touch[®], Bio Molecular Systems Mic qPCR Cycler, QIAGEN[®] Rotor-Gene (wyłącznie wirnik 72-dołkowy), Roche LightCycler[®] 480 lub sprzęt równoważny).

Uwaga: aparat Roche LC480 wymaga dodatkowej kalibracji i ustawień oprogramowania. Dział pomocy technicznej firmy IDEXX[®] może udzielić instrukcji dotyczących stosowania instrumentów wymienionych powyżej z odczynnikami RealPCR[®].

Zasady postępowania w laboratorium i ostrzeżenia

- Nie używaj odczynników po upływie daty ich ważności
- Wszystkie etapy badania należy wykonać w środowisku wolnym od nukleaz
- Podczas pracy z odczynnikami i kwasami nukleinowymi należy używać rękawic gumowych, bezpudrowych
- Aby zapobiec kontaminacji krzyżowej należy na każdym etapie pipetowania odczynników stosować końcówki do pipet z filtrami, wolne od nukleaz oraz wydzielić fizycznie miejsca pracy (oddzielne pomieszczenia) do ekstrakcji kwasów nukleinowych, przygotowywania mieszanin reakcyjnych do PCR oraz wykonywania samego testu PCR.

Rozpuszczanie odczynników dostarczanych w postaci liofilizatów

Rozpuść liofilizat mieszaniny detekcyjnej CSFV RNA Mix oraz liofilizowaną kontrolę dodatnią (PC), dodając do fiolek ilość wody do testów PCR określoną na etykiecie odczynnika. Pozostaw w temperaturze 18 do 26°C przynajmniej na 10 minut; dokładnie wymieszaj i lekko zwiuruj przed użyciem. Po rozpuszczeniu mieszaniny detekcyjnej CSFV RNA Mix oraz kontroli dodatniej PC rozlej odczynniki w małych objętościach do oddzielnych próbek i zamroź. Przed użyciem, zamrożone odczynniki należy rozmrozić w temperaturze 18° do 26°C przez okres od 15 do 30 minut, łagodnie wymieszać oraz lekko zwirować (~1,500 – 3,000 × g).

Ekstrakcja RNA

Mieszaninę detekcyjną CSFV RNA Mix zwalidowano z wykorzystaniem komercyjnych zestawów do ekstrakcji podanych poniżej. Można stosować również inne metody ekstrakcji, ale po uprzedniej ich walidacji w warunkach laboratoryjnych.

RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX)
RealPCR DNA/RNA Spin Column Kit (IDEXX)
NucleoSpin RNA Kit (Machery Nagel)
QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)

Jeżeli analiza wyizolowanego RNA planowana jest w terminie późniejszym, zaleca się przechowywać próbki RNA w temp. poniżej –15°C. Zaleca się w trakcie badania dołączenie dodatkowej próbki (ślepej) stanowiącej kontrolę ujemną ekstrakcji.

Sposób wykonania oznaczenia

- 1 Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej PCR.
 - Wymieszaj rozmrożoną mieszaninę Master Mix RNA odwracając fiolkę lub łagodnie mieszając na mieszadle.
 - Mieszanina Master Mix RNA jest lepka. Zawsze należy pipetować ją powoli.
 - Dla każdej badanej próbki należy zmieszać 10 μ l mieszaniny detekcyjnej CSFV RNA Mix i 10 μ l mieszaniny Master Mix RNA.
 - Przygotowując mieszaninę reakcyjną PCR, należy najpierw dodać do próbki mieszaninę detekcyjną CSFV RNA Mix, a następnie mieszaninę Master Mix RNA. Przepłucz końcówkę pipety poprzez kilkakrotne pobranie i wypuszczenie Master Mix RNA.
 - Delikatnie wymieszaj na mieszadle, aby zapewnić dokładne wymieszanie składników.
 - Łagodnie przenieś pipetą mieszaninę reakcyjną PCR na płytkę PCR.

Nanieś na płytkę PCR w ciągu 20 minut od przygotowania lub przechowuj w temp. 2–8°C do 4 godzin. Mieszaninę reakcyjną PCR Mix można przechowywać w temp. od –25 do –15°C maksymalnie do 2 tygodni. Chroń przed światłem.

- 2 Nanieś po 20 μ l mieszaniny reakcyjnej PCR do odpowiedniej liczby dołków płytki.
- 3 Dodaj po 5 μ l badanego RNA do dołków z naniesioną wcześniej mieszaniną reakcyjną PCR. Końcowa objętość reakcji wynosi 25 μ l.
- 4 Do każdego badania włącz Kontrolę Dodatnią (5 μ l) oraz kontrolę ujemną PCR (5 μ l wody do testów – RealPCR Grade Water).
- 5 Zakryj przykrywką lub zaklej płytkę i jeżeli istnieje taka potrzeba lekko odwiruj, celem usunięcia pęcherzyków powietrza oraz osadzenia całej zawartości na dnie dołka.
- 6 Wybierz w termocyklerze profil temperaturowy "IDEXX' RealPCR' Standard DNA/RNA".

Ustawienia dla reportera i wygaszacza

<u>Cel</u>	<u>Reporter</u>	<u>Wygaszczaz</u>
CSFV	FAM [*]	BHQ [*] (brak)
Wewnętrzna Kontrola Próbkki (ISC/IPC)	HEX [*] (VIC)	BHQ (brak)
Referencja bierna	ROX [*]	Nie dotyczy

Profil temperaturowy IDEXX RealPCR Standard DNA/RNA

	<u>Temperatura</u>	<u>Czas</u>	<u>Cykle</u>
Odwrotna transkrypcja (RT)	50°C	15 min	1
Denaturacja	95°C	1 min	1
Amplifikacja [§]	95°C	15 s	45
	60°C	30 s	

[§]Odczyt fluorescencji powinien odbywać się po etapie amplifikacji w temp. 60°C.

7 Analiza wyników badania

Po skonfigurowaniu oprogramowania instrumentu każdemu kierunkowi badania i kontroli wewnętrznej należy przypisać niepowtarzalny identyfikator. Na przykład, jeśli na tej samej płytce wykonywane jest badanie w kierunku A i B, dolki A należy analizować niezależnie od dolków B. Uzyskane wyniki odczytane w oparciu o instrukcję obsługi posiadanego urządzenia. Aby ustawić wartość progową testu należy wybrać opcję automatyczną: „Auto Ct setting”.

- W termocyklarach Agilent Mx3000P[®] oraz Mx3005P[®] do analizy należy wybrać metodę oznaczania progu fluorescencji opartą o sygnał tła (background-based threshold fluorescence method).
- QIAGEN[®] Rotor-Gene należy ręcznie wyregulować linię odcięcia nad linią tła w liniowej fazie amplifikacji wykładniczej. Najlepiej jest to zrobić na widoku wykresu logarytmicznego i należy to zrobić dla każdego produktu reporterowego w badanej mieszaninie docelowej.
- Termocyklery firmy Applied Biosystems[®] - w pewnych sytuacjach opcja automatycznego ustawiania linii odcięcia nie pozwala osiągnąć prawidłowych wyników. W takich przypadkach konieczne jest ręczne ustawienie linii odcięcia w celu uzyskania wartości Ct. Najlepiej jest to zrobić na widoku wykresu logarytmicznego i należy to zrobić dla każdego produktu reporterowego w badanej mieszaninie docelowej.

Kryteria walidacji testu

	Wartość Ct dla FAM [*]	Wartość Ct dla HEX [*] (VIC)
Kontrola Dodatnia	<38	<38
Kontrola Ujemna PCR	Brak sygnału	Brak sygnału

8 Interpretacja uzyskanych wyników

Wynik badania	Sygnal FAM	Sygnal HEX (VIC)	Inne cechy
Wykryto RNA CSFV	Tak	Tak/Nie	Dodatnia wartość Ct oraz charakterystyczny kształt krzywej amplifikacji w porównaniu do kontroli ujemnej PCR. Spodziewana jest obecność krzywej amplifikacji kontroli wewnętrznej w kanale HEX (VIC); w przypadku próbek silnie CSFV- dodatnich można jednak uzyskać ujemny wynik wewnętrznej kontroli próbki (ISC). [†]
Nie wykryto RNA CSFV	Nie	Tak	Krzywa amplifikacji dla kanału kontroli wewnętrznej HEX (VIC).
Nieważny [‡]	Nie	Nie	Brak krzywej amplifikacji dla kanałów FAM i HEX (VIC) oznacza wynik nieważny.

[†]Mieszanina detekcyjna jest zoptymalizowana pod kątem wykrywania RNA CSFV; próbka silnie dodatnia pod względem RNA może zakłócić detekcję kontroli wewnętrznej.

[‡]Nieważny wynik badania próbki może wskazywać na błąd techniczny nanoszenia próbki, ekstrakcji i/lub reakcji PCR. Zaleca się wykonanie pięciokrotnego rozcieńczenia badanego RNA w wodzie do testów PCR i powtórzenie badania razem z próbką nierozcieńczonego RNA. Jeżeli wynik badania nadal jest nieważny zaleca się ponowne przeprowadzenie ekstrakcji.

Pomoc techniczna:


IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 lub +1 207 556 4895

IDEXX Europe Tel: +800 727 43399

Skontaktuj się z regionalnym przedstawicielem IDEXX, dystrybutorem firmy IDEXX bądź odwiedź stronę internetową: idexx.com/contactlpd

Informacje o patentach: idexx.com/patents

©2024 IDEXX Laboratories, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.

 Barwniki wykorzystane w niniejszym produkcie są sprzedawane na licencji firmy Biosearch Technologies, Inc. i są chronione patentami w USA i na świecie (już wydanymi lub zgłoszonymi). Licencja obejmuje zastosowania weterynaryjne i dotyczące ludzi, ograniczone do badań i rozwoju oraz zastosowań diagnostycznych.

*IDEXX, RealPCR i Test With Confidence są znakami towarowymi lub zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy IDEXX Laboratories lub spółek zależnych w USA i/lub innych krajach. Wszystkie inne produkty i nazwy firm oraz logo to znaki towarowe lub zastrzeżone znaki towarowe ich właścicieli.



Menü



Drucken

Deutsche Version

RealPCR* CSFV RNA Test

Nur zum tierärztlichen Gebrauch

Bezeichnung und Verwendungszweck

Der RealPCR* CSFV RNA Test wird zum Nachweis von RNA des Klassischen Schweinepest Virus (CSPV) verwendet. Dabei wird die CSPV-RNA aus Blut (EDTA), Serum, Plasma, Speichelflüssigkeit, Tupferproben und Gewebe (Lunge, Milz, Niere, Knochenmark, Lymphknoten und Tonsillen) von Schweinen einschliesslich Wildschweinen extrahiert. Gewebeproben können als Sammelprobe (Pools) von maximal 10 Proben untersucht werden. Blut (EDTA), Plasma und Serum können als Sammelprobe (Pools) von maximal 20 Proben untersucht werden. Speichelflüssigkeit kann als Sammelprobe aus Buchten mit bis zu 30 Schweinen getestet werden. Eine Sammelprobe, in der nur eine einzige schwache Probe enthalten ist (z. B. Ct > 32), kann aufgrund des Verdünnungseffekts ein negatives Testergebnis aufweisen.

Allgemeine Hinweise

KSPV ist der Erreger der klassischen Schweinepest (KSP), einer hoch ansteckenden hämorrhagischen Krankheit, an der Wild- und Hausschweine erkranken. KSP ist durch hohe Morbiditäts- und Mortalitätsraten gekennzeichnet, was große wirtschaftliche Verluste in der Schweineindustrie verursacht. Die Krankheit steht auf der Liste der Tierseuchen der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE).

Mit KSPV infizierte Schweine können große Virusmengen ausscheiden, bevor sie erste klinische Krankheitssymptome zeigen. Wenn Tiere eine akute oder subakute Infektion überleben, können sie eine chronische Infektion entwickeln, bei der sie das Virus bis zu ihrem Tod intermittierend oder kontinuierlich ausscheiden. Bei trächtigen Säuen kann das KSPV die Plazenta überwinden und die Föten infizieren, was zu Missbildungen, Mumifikation von Föten und Totgeburten führt. Eine Infektion in der Mitte der Trächtigkeit (ca. 50. bis 70. Trächtigkeitstag) kann zur Geburt schwacher oder persistent virämischer Ferkel führen. Diese persistent infizierten Ferkel können über mehrere Monate hinweg große Mengen an Viren ausscheiden.

Das IDEXX® RealPCR Testsystem ist modular aufgebaut und kombiniert einen krankheitsspezifischen Target-Mix mit einem standardisierten DNA- oder RNA-Master-Mix. Die Reagenzien sind einzeln verpackt und werden separat verkauft, um eine flexible Handhabung zu ermöglichen.


Der RealPCR CSFV RNA Mix (CSFV RNA Mix) enthält Primer und Sonden für den Nachweis von KSPV-RNA mittels Amplifikation mit dem RealPCR RNA Master Mix (RNA MMx). Bei dem Test handelt es sich um eine reverse Transkriptase/Polymerasereaktion in einem Röhrchen. Die interne Kontrolle für den Test basiert auf dem Nachweis einer endogenen porcinen RNA-Sequenz in der Wirtsprobe und wird in diesem Protokoll als interne Probenkontrolle (Internal Sample Control, ISC) bezeichnet. Beim Nachweis endogener RNA in Proben von Schweinen werden Zugabe, Extraktion und Amplifikation der Probe kontrolliert. Die Primer und die Sonden für den Nachweis der internen Probenkontrolle sind im CSFV RNA Mix enthalten. Die ebenfalls optional erhältliche interne Positivkontrolle (RealPCR Internal Positive Control, IPC \geq v1.1) sollte verwendet werden, wenn die endogene Wirts-RNA in geringer Konzentration vorliegt oder nach der Extraktion mit geringer Wahrscheinlichkeit überhaupt vorhanden ist (z. B. in Umweltproben). Die IPC enthält eine synthetische Version der ISC-RNA-Zielsequenzen vom Schwein und ist deshalb mit dem CSFV RNA Mix kompatibel. Weitere Angaben und Anweisungen sind der Produktbeilage zur RealPCR Internal Positive Control ([REF](#) 99-56330) zu entnehmen.

Materialien und Lagerung

Identifizierung/ Allgemeine Hinweise	Kappenfarbe	Menge	Lagerung		Gefrier-/ Auftauzyklen
		100 tests	Nach Erhalt	Nach der Rekonstitution	
RealPCR[®] CSFV RNA Mix (CSFV RNA Mix), (lyophilisiert) [REF] 99-56022 Mit PCR-Wasser auf 1 ml auffüllen. Den CSFV RNA Mix an einem dunklen Ort aufbewahren. Das auf dem Fläschchen angegebene Verfalldatum gilt sowohl für die lyophilisierte als auch für die rekonstituierte Form. Das CSFV RNA Mix Etikett zeigt die PC Version an, welche mit dem Target-Mix kompatibel ist. Zum Beispiel bedeutet PC ≥ 1.4, dass der Target-Mix mit der PC Version 1.4 und allen Versionen größer als 1.4 verwendet werden kann.	Gelb	1 x 1,0 ml	-25 bis 8°C	-25 bis -15°C	≤6
RealPCR RNA Master Mix (RNA MMx) [REF] 99-56280 Der konzentrierte Master Mix enthält Reverse Transkriptase und 'Hot-start' Polymerase zur Verwendung eines RNA-Target-Mix im IDEXX [®] RealPCR System. Der RNA MMx weist eine höhere Viskosität als die meisten Master Mix-Produkte auf. Im Abschnitt Testverfahren sind Empfehlungen für die Handhabung aufgeführt. Für die Normalisierung von Volumenungenauigkeiten wurde ein Referenzfarbstoff (ROX [®]) hinzugefügt. Der RNA MMx muss vor Licht geschützt werden.	Schwarz	1 x 1,0 ml	-25 bis -15°C (Langzeitlagerung)	entfällt	≤6
RealPCR Positive Control, (PC) (lyophilisiert) [REF] 99-56310 Mit PCR-Wasser auf 500 µl auffüllen. Die PC enthält alle IDEXX RealPCR und ISC-Zielsequenzen (einschließlich der Zielsequenzen für CSFV) und kann mit jedem IDEXX RealPCR Target-Mix verwendet werden. Das auf dem Fläschchen angegebene Verfalldatum gilt sowohl für die lyophilisierte als auch für die rekonstituierte Form. Die RealPCR PC hat eine Versionsnummer (z.B. V 1.3). Sobald ein neuer Target-Mix für die RealPCR Produktlinie entwickelt wird und Zielsequenzen zur PC hinzugefügt werden, ändert sich die PC Version (z.B. V 1.3 wird zu V 1.4). Die PC umfasst die IDEXX Signature (eine einzigartige Oligonukleotidsequenz). Die Anwesenheit von IDEXX Signature im Arbeitsbereich lässt auf eine PC Kontamination schließen. Für Laboratorien, die die PC Kontamination im Arbeitsbereich überwachen möchten, kann die IDEXX Signature mittels RealPCR PC Tracker DNA Mix und RealPCR DNA MMx detektiert werden.	Blau	1 x 500 µl	-25 bis 8°C	-25 bis -15°C	≤6
RealPCR PCR Grade Water [REF] 99-56350 Das ultrareine Wasser (RealPCR PCR Grade Water) wurde zum Gebrauch für die reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR) validiert. Es wird für die Rekonstitution eines RealPCR-Target-Mix und für die Positivkontrolle verwendet. Es wird auch als PCR Negativkontrolle bei jeder Testdurchführung verwendet. Die PCR-Wasserröhrchen dürfen nicht von einem zum anderen PCR-Arbeitsbereich übertragen werden. In jedem Arbeitsbereich separate Wasserröhrchen verwenden, um ein Kontaminationsrisiko zu vermeiden.	Farblos	2 x 1,0 ml	-25 bis 8°C	entfällt	

Hinweis: Am Ende dieser Gebrauchsinformation befindet sich eine Tabelle, welche die im Text und auf den Etiketten verwendeten Symbole erläutert.

Nicht enthaltene, erforderliche Materialien

- Im Handel erhältliches RNA-Extraktionskit
 - Optional—Zentrifuge mit Rotor und Adapter für Multiwell-Platten
 - Mikrozentrifuge für 2 ml Mikroröhrchen (1500 bis 3000 x g)
 - Geeignete persönliche Schutzausrüstung (z. B. Schutzhandschuhe, Laborkittel)
 - Nukleasefreie, aerosolbeständige Pipettenspitzen
 - Sterile Mikroröhrchen für die Zubereitung der PCR-Gemischs
 - Pipetten (5–1000 μ l), welche ausschließlich für die Herstellung des PCR-Gemischs bestimmt sind
 - 96- oder 384-Well-PCR-Platten mit optisch klaren, selbsthaftenden Folien/Plattenabdeckungen
 -  Echtzeit- PCR-Instrument (Applied Biosystems* 7500, Applied Biosystems* 7500 Fast System (Standard und Fast Mode), Applied Biosystems* ViiA* 7, Applied Biosystems QuantStudio 5, Applied Biosystems QuantStudio* Flex, Agilent Mx3000P*, Agilent Mx3005P*, Agilent AriaMx, Bio-Rad CFX96 Touch*, Bio Molecular Systems Mic qPCR Cycler, QIAGEN* Rotor-Gene (nur 72-Well-Rotor), Roche LightCycler* 480 oder gleichwertig).
- Hinweis:** Beim Roche LC 480 sind zusätzliche Kalibrierungs- und Software-Einstellungen nötig. Der IDEXX* Technische Support Service kann Hilfestellung für die Benutzung der weiter oben erwähnten Geräte mit den RealPCR* Reagenzien geben.

Laborpraktiken und Warnhinweise

- Die Reagenzien nicht nach ihrem Verfalldatum verwenden.
- Das gesamte Verfahren muss unter nukleasefreien Bedingungen durchgeführt werden.
- Bei der Arbeit mit den Reagenzien und Nukleinsäuren puderfreie Handschuhe tragen.
- Zur Vermeidung einer Kreuzkontamination stets nukleasefreie, aerosolbeständige Pipettenspitzen verwenden und die Arbeitsbereiche für die Extraktion/Handhabung der Nukleinsäure sowie das Einrichten und Durchführen der PCR voneinander abgrenzen.

Rekonstitution der trockenen Bestandteile

Der CSFV RNA Mix und die PC müssen mit Wasser rekonstituiert und auf das Volumen, das auf dem Etikett angegeben ist, aufgefüllt werden. Das Gemisch bei 18 bis 26°C mindestens 10 Minuten stehen lassen, vor der Verwendung mischen und kurz in der Mikrozentrifuge zentrifugieren. Nach der Rekonstitution des Detektionsgemischs und der Positivkontrolle die benötigten Aliquote herstellen und die Lösungen gefroren aufbewahren. Die gefrorenen Komponenten bei 18 bis 26°C etwa 15 bis 30 Minuten lang auftauen, vorsichtig mischen und kurz in der Mikrozentrifuge zentrifugieren (~1.500 – 3.000 \times g).

RNA Extraktion

Der CSFV RNA Mix wurde mittels der unten aufgeführten kommerziellen Extraktionsverfahren validiert. Es können aber auch andere im Labor validierte Extraktions- oder Lyseverfahren verwendet werden.



- RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX)
- RealPCR DNA/RNA Spin Column Kit (IDEXX)
- NucleoSpin RNA Kit (Machery Nagel)
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)

Wird der Test nicht sofort nach der RNA-Extraktion durchgeführt, muss die aufgereinigte RNA bei $<-15^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden. Es wird empfohlen, eine negative Extraktionskontrolle (Scheinprobe) als Probe mitzuführen.

Testverfahren

1 Herstellung des PCR-Gemischs .

- Den aufgetauten RNA MMx durch Schütteln oder mittels Vortexmischer vorsichtig mischen.
- Der RNA MMx ist eine viskose Lösung; immer langsam pipettieren.
- Das PCR Gemisch durch Mischen von 10 μ l CSFV RNA Mix und 10 μ l RNA MMx herstellen.
- Zur Herstellung des PCR-Gemischs zuerst CSFV RNA Mix und danach RNA MMx in das Röhrchen pipettieren. Mehrmals auf- und abpipettieren, um die MMx-Pipettenspitze zu spülen.
- Die Lösung sanft durch Umdrehen oder auf dem Vortexmischer durchmischen, um sicherzustellen, dass alle Bestandteile gut durchmischt sind.
- Das PCR-Gemisch langsam in die PCR-Platte pipettieren.

In die PCR-Platte innerhalb von 20 Minuten pipettieren oder bei 2 bis 8°C bis zu 4 Stunden aufbewahren. Das PCR-Gemisch kann bei -25 bis -15°C bis zu 2. Wochen aufbewahrt werden. Vor Licht schützen.

2 Mit einer Pipette 20 μ l des PCR-Reaktionsgemischs in die entsprechende Anzahl von Wells der Multiwell-Platte pipettieren.

3 Jedem Well 5 μ l der Proben-RNA zugeben. Das endgültige Reaktionsvolumen beträgt 25 μ l.

4 Für jeden Lauf wird eine PC (5 μ l) und eine PCR-Negativkontrolle (5 μ l PCR-Wasser) mitgeführt.

5 Die Platte abdecken. Falls notwendig, die Platte kurz zentrifugieren, damit sich der Inhalt absetzen kann und Luftblasen entweichen können.

6 Den Thermal Cycler mit IDEXX® RealPCR® Standardeinstellung für DNA/RNA Cycling Programm einrichten.

Einstellungen für Reporter und Quencher

<u>Target</u>	<u>Reporter</u>	<u>Quencher</u>
CSFV	FAM*	BHQ* (keine)
Interne Kontrolle (ISC/IPC)	HEX* (VIC)	BHQ (keine)
Passive Referenz	ROX*	entfällt

RealPCR Standard DNA/RNA Cycling Programm

	<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>	<u>Zyklen</u>
Reverse Transkription (RT)	50°C	15 Min	1
Denaturierung	95°C	1 Min	1
Amplifikation [§]	95°C	15 Sek	45
	60°C	30 Sek	

[§]Sicherstellen, dass das Instrument richtig eingestellt ist, um die Fluoreszenz nach dem bei 60°C durchgeführten Amplifikationsschritt aufzuzeichnen.

7 Analysieren der Daten

Bei Einstellung der Gerätesoftware eine eindeutige Zuordnung zu jedem Target und jeder internen Kontrolle herstellen. Wenn z.B. Target A und Target B auf einer Platte aufgetragen wurden, muss Well A unabhängig von Well B analysiert werden. Anleitungen zur Datenanalyse der Gebrauchsanleitung des jeweiligen Geräts entnehmen. Zur Bestimmung des Schwellenwerts die Auto Ct Einstellung wählen.

- Agilent Mx3000P* und Mx3005P* – für die Analyse die "background-based threshold fluorescence" Methode benutzen.
- QIAGEN* Rotor-Gene-Gerät– die Schwellenlinie in der linearen Phase der exponentiellen Amplifikation manuell über den Hintergrund adjustieren. Das funktioniert am besten mit Logview-Plots und sollte für jeden Reporter des Target-Mix* wiederholt werden.
- Applied Biosystems* Geräte– in bestimmten Situationen produziert die 'auto threshold' Einstellung keine zufriedenstellenden Resultate. In diesen Fällen ist ein manuelles Adjustieren des Schwellenwerts erforderlich, um die Ct Werte zu ermitteln. Das funktioniert am besten mit Logview-Plots und sollte für jeden Reporter des Target-Mix* wiederholt werden.

Validitätskriterien

	FAM* Ct-Wert	HEX* (VIC) Ct-Wert
Positive PCR-Kontrolle	<38	<38
Negative PCR-Kontrolle	Kein Signal	Kein Signal

8 Interpretation der Ergebnisse.

Testergebnis	FAM Signal	HEX (VIC) Signal	Andere Merkmale
CSFV-RNA positiv	Ja	Ja/Nein	Ein positiver Ct-Wert und eine charakteristische Amplifikationskurve im Vergleich zur PCR Negativkontrolle. Eine Amplifikationskurve für die interne Kontrolle im HEX (VIC) Kanal ist zu erwarten; es können jedoch einige stark CSFV-positive RNA- Proben ein negatives Ergebnis für die interne Kontrolle aufweisen. [†]
CSFV-RNA negativ	Nein	Ja	Amplifikationskurve im HEX (VIC) Kanal für die interne Kontrolle.
Ungültig [‡]	Nein	Nein	Das Fehlen einer Amplifikationskurve in den FAM und HEX (VIC) Kanälen zeigt ein ungültiges Resultat an.

[†]Die Target-Mix-Reagenzien wurden für die Detektion von CSFV RNA optimiert; eine stark positive RNA Probe kann durch Competition die Detektion der internen Kontrolle verhindern.

[‡]Eine ungültige Probe kann auf eine falsche Probenzugabe, Extraktion und/ oder PCR zurückzuführen sein. Es wird empfohlen die RNA 5-fach in PCR Wasser zu verdünnen und erneut zu testen; die unverdünnte RNA als Probe mitführen. Sollte der Test immer noch ungültig sein wird eine erneute Extraktion empfohlen.

Technische Unterstützung:


IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 oder +1 207 556 4895

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Kontaktieren Sie Ihren lokalen IDEXX-Vertreter oder besuchen Sie unsere Webseite: idexx.com/contactlpd

Patentinformationen: idexx.com/patents

©2024 IDEXX Laboratories, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

-  Die in diesem Produkt enthaltenen Farbstoffe werden unter der Lizenz von Biosearch Technologies Inc. verkauft und sind unter US- und internationalen Patenten oder Patentanmeldungen geschützt. Die Lizenz gilt für Anwendungen in der Veterinärmedizin und beim Menschen und ist auf Forschung und Entwicklung sowie diagnostische Zwecke beschränkt.

*IDEXX, RealPCR und Test With Confidence sind Marken oder eingetragene Marken der IDEXX Laboratories oder ihrer Tochterunternehmen in den Vereinigten Staaten und/oder in anderen Ländern. Alle anderen Produktnamen, Firmennamen und Logos sind Schutzmarken oder eingetragene Schutzmarken von ihrer jeweiligen Eigentümer.

**Symbol Descriptions / Descriptions des symboles / Descrições do símbolos / Opisy symboli
Descripciones de los símbolos / Symbol-Beschreibungen / Descrizione dei simboli**



Batch Code (Lot) / Numéro de lot / Código de lote (Lote) / Kod partii / Número de Partida (Lote)
Chargenbezeichnung (Ch.-B.) / Codice del lotto (partita)



Serial Number / Numéro de série / Número de série / Numer seryjny
Número de serie / Seriennummer / Numero di serie



Catalog Number / Numéro de catalogue / Número de catálogo / Numer katalogowy
Número de catálogo / Katalognummer / Numero di catalogo



Authorized Representative in the European Community
Représentant agréé pour la Communauté européenne
Representante autorizado na Comunidade Européia
Upoważniony przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej
Representante autorizado en la Comunidad Europea
Autorisierte EG-Vertretung
Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea



Use by date / À utiliser avant la date / Data de Vencimento / Użyć przed
Usar antes de / Verwendbar bis / Usare entro



Date of manufacture / Date de fabrication / Data de Fabricação / Data produkcji
Fecha de fabricación / Herstellungsdatum / Data di produzione



Manufacturer / Fabricant / Fabricante / Wytwórca
Fabricante/ Hersteller / Ditta produttrice



Temperature limitation / Limite de température / Limite de temperatura
Limite de temperatura / Zakres temperatur / Zulässiger Temperaturbereich
Limite di temperatura



Consult instructions for use / Consulter la notice d'utilisation
Consulte instruções para o uso / Sprawdź w instrukcji obsługi
Consultar las instrucciones de uso / Gebrauchsinformation beachten
Consultare le istruzioni per l'uso



Major change in the user instructions
Modification majeure du mode d'emploi
Modificações importante nas instruções de uso
Większe zmiany w instrukcji wykonania
Modificación importante en el manual de instrucciones
Wesentliche Änderung der Gebrauchsinformation
Modifica importante nell'inserto tecnico

IDEXX Laboratories, Inc.
One IDEXX Drive
Westbrook, Maine 04092
USA

Manufacturer
IDEXX Montpellier SAS
326 rue de la Galéra
34090 Montpellier
France

EU-Representative
IDEXX B.V.
P.O. Box 1334
2130 EK Hoofddorp
The Netherlands

idexx.com

IDEXX