



EliGene® TBEV LC

REF 90070-LC (pro 50 stanovení)

Složení soupravy

5 x 150 µl TBEV LC Mix
1 x 55 µl Enzyme Mix
2 x 260 µl IC RNA
2 x 50 µl PC DNA TBEV
Návod k použití

Skladování a doba použitelnosti:

Veškeré komponenty musejí být přepravovány a uloženy při -20 °C. Kit a zbývající MasterMixy musejí být skladovány při -20 °C v temnu.

Účel použití

EliGene® TBEV LC kit je určen pro detekci RNA viru klíšťové encefalitidy (TBE viru).

Souprava je určena pouze pro výzkumné účely. Není určeno pro diagnostiku.

Princip metody

Diagnostická souprava je založena na reverzní transkripci s qPCR v jedné zkumavce. V tomto kitu jsou pro detekci TBE viru a interní kontroly použity primery a fluorescenčně značené sondy (FAM a HEX).

Obecný úvod

Klíšťová encefalitida je infekční onemocnění napadající mozek a mozkové blány. Onemocnění se nejčastěji projevuje jako meningitida, encefalitida nebo meningoencefalitida. Onemocnění je známé u přežvýkavců, hlodavců, ptáků, šelem, koní a lidí. Přenos původců ze skupiny *Flaviridae* se uskutečňuje klíšťaty nebo alimentární cestou. Onemocnění může být zoonózou.

Odběr vzorku, zpracování a uchování

Klinický materiál:

Mozkomíšni mok, sérum, plasma

Klíšťata

Doporučená izolace RNA:

Manuální: QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)

Automatická: NA Body Fluid Kit (Chemagen-PerkinElmer)

Manuální: RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen)

Sérum, plasma, mozkomíšni mok: Dle standardního postupu odeberte vzorky séra nebo plasmy do sterilních zkumavek. Vzorky musejí být skladovány a přepravovány při -20 °C.

Tento kit je optimalizován pro izolaci za použití **BodyFluid DNA/RNA isolation** kitu dle standardního protokolu a pro vzorky plasmy s elucí do 50 µl PCR elučního pufru.

Počáteční objem je 200 µl séra nebo plasmy a eluční objem je 50 µl PCR vody. Před izolací musí být ke 200 µl vzorku přidáno 10 µl interní kontroly RNA (IC RNA). RNA musí být izolována do PCR vody vzhledem k možné inhibici reakce díky složení elučního pufru.

Velmi se doporučuje provést analýzu ihned po izolaci RNA. RNA může být uchovávána při -20 °C, ale koncentrace



RNA s každým zamražením klesá, což může vést k falešně negativnímu výsledku. Z tohoto důvodu je doporučeno provést RT-PCR ihned po izolaci RNA.

Nezbytné vybavení pro laboratoř

- Sterilní automatická pipeta 5–20 µl a sterilní špičky s filtrem pro DNA/RNA a DNáz a RNáz (doporučujeme plast pro diagnostické účely s certifikátem CE).
- Sterilní stojánek pro DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- Zařízení pro Real Time PCR – kit je optimalizován pro přístroje LightCycler 480, RotorGene 6000 nebo RotorGene Q (Qiagen), QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific), CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).
- Sterilní plast (stripy, destičky, zkumavky) bez DNáz a RNáz vhodný pro daný Real Time PCR přístroj.
- Laboratorní ochranné rukavice.

Konfigurace RealTime PCR přístroje

- Pro detekci TBE viru je použita sonda značená FAM barvou (exc. 494 nm – em. 518 nm)
- Pro detekci Interní kontroly je použita sonda značená HEX barvou (exc. 520 nm – em. 548 nm)

LightCycler® 480 (Roche):

Pro reakci používejte pouze bílé destičky. Použití průhledných destiček může vést k poklesu citlivosti kitu. Nepoužívejte destičky opakovaně; při manipulaci s destičkou může dojít ke kontaminaci laboratoře.

V okně "Detection format" zvolte "Dual Color Hydrolysis probe".

Nastavte následující teplotní profil:

Step 1 - Analysis mode "None", 1 Cycle

55°C	15 min	Ramp rate (4.4°C/s)	Acquisition mode "None"
------	--------	---------------------	-------------------------

Step 2 - Analysis mode "None", 1 Cycle

95°C	5 min	Ramp rate (4.4°C/s)	Acquisition mode "None"
------	-------	---------------------	-------------------------

Step 3 - Analysis mode "Quantification", 50 Cycles

95°C	15 s	Ramp rate (4.4°C/s)	Acquisition mode "None"
55°C	20 s	Ramp rate (2.2°C/s)	Acquisition mode "Single"
72°C	25 s	Ramp rate (4.4°C/s)	Acquisition mode "None"

Step 4 - Analysis mode "None", 1 Cycle

40°C	1 min	Ramp rate (2.2°C/s)	Acquisition mode "None"
------	-------	---------------------	-------------------------

Kompletní teplotní profil může být načten jako Run Template "EliGene_TBVEV_LC480_v00.ixo". Run Template může být importován do softwaru v menu "Navigator" kliknutím na ikonu "Import" z CD přiloženého v kitu.



RotorGene 6000 nebo Q (Qiagen):

V okně "New Run" vyberte "Three Step".

Vyberte příslušný typ rotoru "Rotor Type" a klikněte na tlačítko "Next".

Nastavte následující teplotní profil:

Udržovací fáze (Holding stage)

55°C 15 min

Udržovací fáze (Holding stage)

95°C 5 min

Cyklovací fáze (Cycling stage) – 50 cyklů

95°C 15 s

55°C 20 s Odečet signálu v kanálech "Green", "Yellow"

72°C 25 s

Kompletní teplotní profil může být načten jako Run Template "EliGene_TBEG_RG_v00.ret". Run Template může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

CFX96 Touch (Bio-Rad):

V úvodní možnosti "Startup Wizard" založte "New Experiment" a vytvořte nový protokol "Create New Protocol".

Nastavte následující teplotní profil:

Step 1 55°C 15 min

Step 2 95°C 5 min

Step 3 95°C 15 s

Step 4 55°C 20 s + Plate Read

Step 5 72°C 25 s

Step 5 GOTO Step 3 49x

Step 6 40°C 60 s

Doplňte "Sample Volume" na 20 µl.

Sběr dat emisního signálu je v kroku Step 4 při 55 °C.

Pro nastavení filtrů použijte v „Scan Mode“ všechny kanály, ale v „Plate Manager“ nastavení pro vzorky vyberte pouze fluorofory FAM a HEX. Označte pozice s umístěnými vzorky jako „Unknown“ vzorky nebo „Standard“. Kompletní teplotní profil může být nahrán jako Run Template " EliGene_TBEG_CFX96_v00.ix0_v00.pcr1" anebo může být zkopírován z CD přiloženého v kitu.

QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific):

Vyberte možnosti Experiment type, "Presence/Absence", Chemistry "TaqMan Probes" a Run Mode "Standard". Jako reportér vyberte barvy FAM (TBEV) a VIC (IC RNA), jako pasivní referenční barvivo zvolte NONE.

Nastavte následující teplotní profil:

Udržovací fáze (Holding stage)

55°C 15 min Ramp rate (1.6°C/s)

95°C 5 min Ramp rate (1.6°C/s)

Cyklovací fáze (Cycling stage) – 50 cyklů



95°C 15 s Ramp rate (1.6°C/s)
55°C 20 s Ramp rate (1.6°C/s) Data collection ON
72°C 25 s Ramp rate (1.6°C/s)

Post-Read Stage

40°C 1 min Ramp rate (1.6°C/s)

Sběr dat emisního signálu v druhém kroku cyklovací fáze při 55 °C.

Kompletní teplotní profil může být načten jako Run Template "EliGene_TBEV_QS5_v00.edt". Run Template může být importován do softwaru z CD přiloženého v kitu.

Příprava reagensí

- Pro zamezení kontaminace udržujte všechny zkumavky zavřené a postupujte dle instrukcí.
- Před použitím musí být všechny reagensie zcela rozmrazené, krátce promíchané na vortexu a stočené.
- V kroku izolačního protokolu, kdy se k izolovanému vzorku přidává Proteináza K, přidejte také 10 µl interní kontroly RNA (IC RNA). **V žádném případě nepřidávejte interní kontrolu k vyizolované RNA těsně před analýzou!**

Upozornění: Upozorňujeme na možnost kontaminace vzorku v laboratorním prostředí. Používejte odlišnou mikropipetu pro pipetování MasterMixu, odlišnou mikropipetu pro pipetování vzorků a odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol. Dodržujte veškerá doporučení pro laboratoře provádějící DNA analýzy.

Příprava reakčního mixu

Upozornění: Upozorňujeme na možnost kontaminace vzorku v laboratorním prostředí. Používejte odlišnou mikropipetu pro pipetování MasterMixu, odlišnou mikropipetu pro pipetování vzorků a odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol. Dodržujte veškerá doporučení pro laboratoře provádějící DNA analýzy.

- Příprava MasterMixu:** Připravte MasterMix smícháním Enzyme Mixu s TBEV LC Mixem. Vezměte jednu zkumavku s TBEV LC Mixem a nechte rozmraznout při pokojové teplotě. Ihned po rozmrazení krátce stočte a do zkumavky přidejte 10 µl Enzyme Mixu (1rxn = 14µl mixu + 1µl enzymu). Propipetujte a krátce stočte.
- Detekce:** Vezměte jednu zkumavku s MasterMixem a přidejte 15 µl připraveného mixu do mikrozkumavky a přidejte 5 µl izolované RNA. Během pipetování vzorku buďte opatrní, abyste zabránili vzájemné kontaminaci vzorků. Nezamrazujte mikrozkumavky s MasterMixem opakovaně.
- Pozitivní kontrola:** Vezměte jednu zkumavku s MasterMixem a napipetujte 15 µl MasterMixu do mikrozkumavky a přidejte 5 µl PC DNA TBEV. Během pipetování pozitivní kontroly buďte opatrní, abyste zabránili kontaminaci vzorků. Používejte odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol.

Vložte mikrozkumavky nebo skleněné kapiláry do RealTime PCR přístroje a spusťte program dle kapitoly Konfigurace RealTime PCR přístroje výše.

Odečet výsledků

LightCycler® 480 (Roche):

V nabídce "Sample Editor" zvolte možnost "Abs Quant".

V nabídce "Analysis" zvolte možnost "Abs Quant/2nd Derivative Max".

V okně "Analysis" klikněte na ikonu "Color Comp" a zvolte Universal CC FAM (510)-VIC (580) calibration. Analyzujte výsledky kliknutím na ikonu "Calculate".

Pozitivní výsledek pro TBE virus: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu (465-510). V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.



Interní kontrola (IC RNA) je amplifikována pokaždé. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu (533-580).

RotorGene 6000 nebo Q (Qiagen)- verze 1.7 a vyšší:

Klikněte v hlavní nabídkové liště na ikonu "Analysis" a vyberte Analýzu "Quantitation". V okně „Quantitation Analysis“ zvolte možnosti "Dynamic Tube" a "Slope Correct".

Pozitivní výsledek pro *TBE virus*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM (Green) kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Interní kontrola je amplifikována pokaždé. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu v HEX kanálu (Yellow).

QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific):

V nabídce "Analyse Settings" edituje původní parametry pro Ct u jednotlivých kanálů (FAM, VIC), zvolte možnost "Automatic Baseline" a analyzujte výsledky kliknutím na možnost "Apply".

Pozitivní výsledek pro *TBEV*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu. V případě negativního výsledku nedojde k amplifikaci.

Interní kontrola (IC RNA) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve VIC (HEX) kanálu.

CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad):

V okně "Data Analysis" zvolte možnost "Quantification". V „Setting“ menu zvolte možnost „Baseline Setting“ a vyberte „Baseline Subtracted Curve Fit“ a možnost „Apply Fluorescence Drift Correction“.

Poté v okně "Data Analysis" vyberte jednotlivé fluorofory (FAM, HEX) kliknutím na box s jejich označením pod amplifikačním grafem a odečtěte výsledky jednotlivých vzorků.

Pozitivní výsledek pro *TBEV*: Pozitivní výsledek je charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve FAM kanálu. V případě negativního výsledku k amplifikaci nedojde.

Interní kontrola (IC RNA) musí být vždy amplifikována v každém vzorku. Interní kontrola je charakterizována amplifikací spojenou s nárůstem signálu ve VIC (HEX) kanálu.

Interpretace výsledků

Negativní výsledek

Pokud nedojde k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu FAM před 50. cyklem, lze výsledek interpretovat jako pravděpodobně *TBE virus* RNA negativní nebo koncentrace RNA TBE viru je pod detekčním limitem soupravy (50 genomových RNA/reakcí). Signál pro interní kontrolu (IC RNA) musí být pozitivní. Výsledek nevylučuje přítomnost infekce TBE virem, protože výsledky testu jsou závislé na správném odběru vzorku a jeho zpracování. Výsledky jsou též závislé na přítomnosti dostatečného množství analyzované RNA TBE viru.

Pozitivní výsledek

Amplifikační signál ve FAM kanálu se objeví před 45. cyklem. RNA TBE viru byla detekována ve vzorku. Vzorek je *TBE virus* RNA pozitivní.



Upozornění: Upozorňujeme na možnost kontaminace vzorku v laboratorním prostředí. Používejte odlišnou mikropipetu pro pipetování MasterMixu, odlišnou mikropipetu pro pipetování vzorků a odlišnou mikropipetu pro pipetování pozitivních kontrol. Dodržujte veškerá doporučení pro laboratoře provádějící RNA analýzy.

Inhibovaný vzorek

V případě, že nedojde k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu FAM (specifického pro RNA TBE viru) a ani k nárůstu amplifikačního signálu v kanálu HEX (specifického pro interní kontrolu), je nutné analýzu zopakovat nejlépe s nově izolovanými vzorky RNA.

Kontrolní postup

Souprava EliGene® TBEV LC zahrnuje interní kontrolu (IC RNA). Interní kontrola sleduje kvalitu izolace RNA a detekuje případné chyby v procesu izolace RNA. Detekuje také případné inhibice amplifikačního procesu. V případě, že vzorek je *TBE virus* RNA negativní, Ct interní kontroly musí být Ct < 35. Interní kontrola musí být přidávána přímo ke vzorku před izolací.

Referenční materiál

Ke sledování všech postupů zahrnující RNA izolaci a RealTime PCR detekci můžete použít referenční virový materiál.

Řešení problémů

1. V případě, že nedojde k amplifikaci interní kontroly, může jít o závadu v postupu izolace DNA, použití kitu po době expirace nebo o závadu na přístroji pro RealTime PCR.
2. V případě, že se neamplifikuje pozitivní kontrola, může jít o použití kitu po době expirace nebo o závadu na přístroji pro RealTime PCR.

Funkční charakteristiky

Analytické funkční charakteristiky:

Analytická citlivost je 50 kopií *TBE viru* RNA v reakčním mixu.

Analytická specifita metody je 100%. Analytická specifita metodiky byla ověřena srovnáním primerů a sond se všemi známými DNA sekvencemi v databázi GenBank. Analytická specifita bylo rovněž analyzována přidáním DNA z EBV, CMV, HCV, HBV, HSV1, HSV2, VZV, MTB, *Borrelia* sp., *C. trachomatis*, *E. coli*, *A. niger*, *C. albicans* k reakčnímu mixu. Tyto DNA nebo RNA neposkytly falešně pozitivní výsledek na přítomnost TBE viru.

Klinická specifita byla testována na negativních vzorcích lidské krve a séra. 50 různých vzorků lidské DNA a RNA nezpůsobilo falešně pozitivní výsledek.

Měřicí interval

Souprava umožňuje detekci 50¹–10⁸ virových RNA molekul v reakční směsi.



Interní kontrola kvality

Jako interní kontrola kvality je použita interní kontrola (IC RNA) pro kontrolu procesu izolace a amplifikace společně s pozitivní kontrolou sledující funkčnost MasterMixu.

Limitace testovacího postupu

Citlivost soupravy je závislá na zacházení se vzorkem (izolace RNA). Je velmi doporučeno používat izolační kity a postupy uvedené výše.

Citlivost detekce RNA *TBE viru* závisí na odběru vzorku, způsobu skladování a způsobu zpracování (RNA izolace, den přijetí vzorku, detekce ihned po izolaci).

Biologické referenční intervaly

Žádné použitelné informace pro tento kit.

Upozornění

Po smíchání je MasterMix stabilní po dobu 30 minut. Nezamrazujte zkumavky s MasterMixem opakovaně! Nemíchejte komponenty kitu z různých šarží.

Obecná varování a bezpečnostní opatření

- Pracujte se všemi biologickými vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem. Vyhněte se přímému kontaktu s biologickými vzorky. Vyhněte se rozlití vzorků a tvorbě aerosolů. Jakýkoliv materiál, který přišel do styku s biologickými vzorky, musí být před umístěním do odpadu autoklávován při 121 °C nejméně 60 minut.
- Pracujete se všemi reagensy a používaným materiálem s vědomím, že mohou přenášet infekční agens. Vyhněte se přímému kontaktu s reagensy. Odpad musí být likvidován v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy. Spotřební materiál musí být spálen. Tekuté odpady obsahující kyseliny nebo zásady musejí být před likvidací zneutralizovány.
- Používejte vhodné ochranné oblečení, rukavice a ochranu očí a obličeje.
- Nikdy nepipetujte roztoky ústy.
- Nejezte, nepijte. Nekuřte a neaplikujte kosmetiku v laboratorních prostorách.
- Řádně si umyjte ruce po práci se vzorky a reagensy.
- Likvidujte zbylé reagensy a odpad v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy.
- Před započatím práce si řádně přečtěte veškeré instrukce uvedené v tomto návodu.
- Při práci postupujte přesně podle návodu k použití.
- Kit nepoužívejte po době expirace, která je uvedena na obalu.
- Používejte pouze reagensy poskytované v rámci kitu a reagensy doporučené výrobcem.
- Nemíchejte reagensy z různých šarží!
- Nepoužívejte reagensy ze souprav jiných výrobců!



Varování a bezpečnostní opatření pro molekulární biologii

- Molekulárně-biologické postupy jako jsou izolace nukleové kyseliny, reverzní transkripce, amplifikace a detekce vyžadují kvalifikovaný personál z důvodu zamezení chybných výsledků, speciálně vzhledem k degradaci nukleových kyselin obsažených ve vzorcích a k možné kontaminaci.
- Je nezbytné mít k dispozici samostatnou místnost pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci. Zabezpečte, aby se produkt amplifikace nikdy nedostal do místnosti pro extrakci nukleových kyselin nebo do místnosti pro přípravu amplifikačních směsí.
- Je nezbytné používat vhodné laboratorní pláště, rukavice a pomůcky určené pro izolaci nukleových kyselin nebo pro přípravu amplifikačních směsí nebo pro detekci. Nikdy nepřenášejte laboratorní pláště, rukavice a pomůcky mezi místnostmi pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci.
- Vzorek, ze kterého se analýza provádí, musí být hned od počátku pro DNA analýzu určen a musí s ním být podle toho nakládáno, např. vzhledem k možné kontaminaci, degradaci nukleových kyselin atd. Vzorek musí být zpracováván v laminárním boxu. Různé vzorky nesmějí být otevřeny ve stejnou dobu. Automatické pipety užívané pro práci s biologickými vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- S reagensy musí být pracováno v PCR boxu (nikoliv v laminárním boxu). Automatické pipety užívané pro práci se vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- S produkty amplifikace je třeba zacházet velmi opatrně, aby nedošlo k jejich rozptýlení do prostředí laboratoří a k případné kontaminaci nově testovaných vzorků.

Varování a bezpečnostní opatření týkající se složek této soupravy

- Mikrozkmavka obsahující TBEV LC Mix je určena pouze pro jedno použití a musí být použita pouze pro přípravu reakční směsi.
- Mikrozkmavka obsahující IC RNA je určena pouze pro jedno použití a musí být použita pouze pro přípravu reakční směsi.
- S tímto mixem pracujte podle bezpečnostních vět (P):

P280 Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

P281 Používejte požadované osobní ochranné prostředky.

V případě jakýchkoliv problémů se obraťte na zákaznické centrum společnosti ELISABETH PHARMACON, spol. s r. o.

Literatura:

Josko D. Molecular virology in the clinical laboratory. Clin Lab Sci. 2010 Fall;23(4):231-6.

Bannister BA, Begg NT, Gillespie SH. 2000. Infectious Disease. Blackwell Science, 2th Ed.



Vysvětlivky



Katalogové číslo



Horní teplotní hranice



Číslo šarže



Spotřebujte do (poslední den v měsíci).



Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*



V souladu s požadavky Evropské Direktivy 98/79/EEC pro diagnostické zdravotnické prostředky *in vitro*.



Obsah dostatečný pro "N" testů



Prosím, řiďte se instrukcemi pro použití.



Výrobce

Výrobce

ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.

Rokycanova 4437/5, 615 00 Brno, Česká republika Tel.: +420 542 213 851, +420 542 213 827

E-mail: info@elisabeth.cz