



AmpliTest *TBEV* (Real Time PCR)

Zestaw do wykrywania sekwencji RNA specyficznych dla *TBEV (Tick – borne Encephalitis Virus)* techniką **Real Time PCR**

<i>Nr kat.</i>	<i>Wielkość zestawu</i>
RV03-100	100 reakcji

Zestaw diagnostyczny jest przeznaczony do profesjonalnego stosowania w laboratoriach badawczych oraz diagnostycznych, w tym medycznych.

Przed użyciem należy zapoznać się z treścią niniejszej ulotki dołączonej do zestawu diagnostycznego.

TRANSPORT

Transport zestawu **AmpliTest TBEV (Real Time PCR)** odbywa się w suchym lodzie. Po otrzymaniu przesyłki należy ją natychmiast rozpakować. Jeżeli stwierdzono uszkodzenie taśmy zabezpieczającej pudełko transportowe, uszkodzenie plomby opakowania handlowego lub brak suchego lodu w styropianowym pudełku transportowym należy o tym fakcie niezwłocznie powiadomić producenta zestawu.

SKŁADNIKI ZESTAWU

Nazwa	Opis	RV03-100 100 reakcji	Kolor wieczka probówki
RM	Mieszanka reakcyjna	2 × 550 µL	zielony
PC	Kontrola pozytywna	1 × 300 µL	czerwony
NC	Kontrola negatywna	1 × 300 µL	niebieski
RT	Odwrotna transkryptaza	1 × 20 µL	czarny
Rin	Inhibitor RNAz	1 × 40 µL	żółty
IC	Kontrola wewnętrzna	2 × 750 µL	przeźroczysty
WATER	Woda	1 × 1500 µL	biały

WARUNKI PRZECHOWYWANIA I UŻYTKOWANIA

- Składniki zestawu należy przechowywać w -20°C.
- UNIKAĆ EKSPOZYCJI SKŁADNIKA RM NA ŚWIATŁO.**
- Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania składników zestawu, w szczególności składnika **RM**. 10 cykli zamrożenia i rozmrożenia składnika **RM** nie wpływa znacząco na jakość zestawu.
- Składniki **IC** oraz **PC** zawierają RNA – należy je chronić przed działaniem rybonukleaz.
- Termin ważności zestawu podany jest na opakowaniu.
- Nie używać składników zestawu po upływie terminu ważności.

OPIS ZESTAWU

Zastosowanie

Zestaw **AmpliTest TBEV (Real Time PCR)** jest przeznaczony do wykrywania sekwencji RNA specyficznych dla TBEV (Tick – borne Encephalitis Virus) wywołującego u ludzi kleszczowe zapalenie mózgu. Obecność sekwencji specyficznych dla patogenu diagnozuje się w preparatach RNA ekstrahowanych z tkanek ludzkich oraz kleszczy. Zestaw diagnostyczny przeznaczony jest do diagnostyki *in vitro*. Zestaw ma charakter jakościowy: służy do potwierdzenia lub wykluczenia obecności wirusowego RNA w analizowanym preparacie.

Zasada działania

TBEV jest wirusem typu RNA należącym do rodziny *Flaviviridae*. Do jego detekcji metodą Real Time PCR konieczny jest proces odwrotnej transkrypcji polegający na syntezie cząsteczek cDNA na podstawie RNA. Zestaw **AmpliTest TBEV (Real Time PCR)** jest zestawem typu *one-step*. Dzięki temu procesy odwrotnej transkrypcji i amplifikacji sekwencji specyficznych dla TBEV zachodzą w jednej probówce. Zestaw **AmpliTest TBEV (Real Time PCR)** zawiera startery umożliwiające namnożenie fragmentu genomu TBEV. Detekcja obecności wirusowych sekwencji następuje dzięki specyficznej sondzie typu TaqMan®, która przyłączając się do powstającego amplikonu (powielanego fragmentu wirusowego genomu) ulega hydrolizie. Podczas hydrolizy z sondy uwalniany jest barwnik fluorescencyjny FAM, który następnie

wykrywany jest przez układ optyczny urządzenia do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR. Odpowiednio dobrane sekwencje sondy i starterów zapewniają wysoką specyficzność reakcji.

W celu zwiększenia wiarygodności wyników, zestaw **AmpliTest TBEV (Real Time PCR)** zawiera system kontroli wewnętrznej, który można wykorzystać do monitorowania prawidłowego przebiegu procesu ekstrakcji kwasów nukleinowych oraz reakcji Real Time PCR. Składnik **RM**, poza układem sondy i starterów służących do wykrywania sekwencji specyficznych dla badanego patogenu, zawiera układ sondy i starterów służący do namnożenia i detekcji kontroli wewnętrznej. Detekcja kontroli wewnętrznej odbywa się dzięki uwalnianiu przez sondę barwnika fluorescencyjnego HEX. Dodatni wynik dla kontroli wewnętrznej stanowi potwierdzenie prawidłowego przebiegu procesu ekstrakcji kwasów nukleinowych i reakcji Real Time PCR.

POTRZEBNY SPRZĘT I DODATKOWE MATERIAŁY

Zestaw **AmpliTest TBEV (Real Time PCR)** umożliwia wykonanie kompletnej procedury diagnostycznej, polegającej na wykryciu obecności TBEV w pobranych próbkach **wyłącznie** w połączeniu z zestawem do ekstrakcji RNA z pobranej próbki oraz urządzeniem do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR.

UWAGA 1. Zestaw **AmpliTest TBEV (Real Time PCR)** jest kompatybilny z urządzeniami do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR posiadającymi możliwość detekcji barwników fluorescencyjnych HEX i FAM; Pełną listę kompatybilnych urządzeń można znaleźć na stronach internetowych producenta zestawu.

UWAGA 2. Zestaw **AmpliTest TBEV (Real Time PCR)** nie zawiera barwnika normalizacyjnego ROX. W przypadku urządzeń wymagających normalizacji, należy do składnika RM dodać barwnik ROX do odpowiedniego stężenia. Barwnik ROX nie jest dołączony do zestawu.

SPECYFIKACJA TECHNICZNA

Kontrola jakości	Zgodna z ISO 13485: Wyroby medyczne – System zarządzania jakością
Optymalna ilość RNA dodawana do reakcji	do 0,5 µg

EKSTRAKCJA RNA

Ze względu na dużą podatność RNA na degradację czas pomiędzy pobraniem materiału biologicznego a ekstrakcją RNA powinien być jak najkrótszy. Do chwili ekstrakcji RNA uzyskany materiał biologiczny powinien być odpowiednio zabezpieczony (przechowywany w -20°C, ewentualnie w 2-8°C, najlepiej w środowisku hamującym aktywność nukleaz, np. w obecności EDTA). Niewłaściwe przechowywanie pobranego materiału biologicznego może skutkować degradacją RNA, co będzie prowadzić do uzyskania wyników fałszywie negatywnych. Ilość wymaganego materiału zależy od użytej metody ekstrakcji DNA.

Do ekstrakcji RNA zaleca się stosowanie zestawów opartych o złoża krzemionkowe (tzw. zestawów kolumnkowych), gdyż zapewniają one uzyskanie preparatów RNA o odpowiedniej jakości. Preparaty RNA należy przechowywać w -20°C (krótki okres przechowywania), w -80°C (długi okres przechowywania). Należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania preparatów RNA i chronić je przed kontaktem z nukleazami. W tym celu należy korzystać z materiałów (woda, próbki, końcówki do pipet itp.) wolnych od nukleaz (potwierdzonych odpowiednimi certyfikatami).

Do kontroli prawidłowego przebiegu procesu ekstrakcji RNA można wykorzystać system kontroli wewnętrznej zawarty w zestawie. W tym celu na początkowym etapie procesu ekstrakcji RNA do próbki należy dodać składnik **IC**. Objętość dodanego składnika **IC** zależy od zastosowanej objętości buforu

elucyjnego zestawu do ekstrakcji RNA. Należy dodać 5 μL składnika **IC** na każde 50 μL użytego buforu elucyjnego.

UWAGA 3. W przypadku stosowania innych metod ekstrakcji niż zestawy kolumnkowe, preparat RNA może zawierać związki, które istotnie zmniejszają wydajność reakcji PCR. Prowadzi to do obniżenia czułości testu, a w skrajnych przypadkach do braku amplifikacji cDNA.

UWAGA 4. Podczas ekstrakcji RNA szczególnie istotny jest etap homogenizacji materiału biologicznego (w przypadku próbek narządów wewnętrznych). Należy zwrócić szczególną uwagę, aby podczas homogenizacji nie doszło do degradacji RNA.

REAKCJA REAL TIME PCR

1. Określić liczbę preparatów RNA poddawanych analizie (**n**).
2. Rozmrozić składniki zestawu, z wyjątkiem składników **RT** i **Rin**. Po rozmrożeniu, dokładnie wymieszać zawartość probówek i krótko je zwirować.

Składniki po rozmrożeniu przechowywać w 2-8°C lub na lodzie.

UNIKAĆ EKSPOZYCJI SKŁADNIKA RM NA ŚWIATŁO.

UWAGA 5. Składniki **RT** (odwrotna transkryptaza) i **Rin** (inhibitor RNAz) utrzymywać przez cały czas w temperaturze poniżej 0°C. Składniki te są wrażliwe na temperaturę i mogą ulegać inaktywacji po ich ogrzaniu.

3. Określić ilość preparatu RNA dodawanego do reakcji (**x** μL).

UWAGA 6. Optymalna ilość RNA dodawanego do reakcji nie powinna przekraczać 1 μg . Duże ilości RNA dodanego do reakcji PCR mogą wpływać na obniżenie wydajności odwrotnej transkrypcji i podwyższyć limit detekcji testu.

WARIANT I: Kontrola wewnętrzna została dodana do próbki podczas procesu ekstrakcji RNA.

UWAGA 7. Należy postąpić według wariantu I, jeżeli system kontroli wewnętrznej jest wykorzystywany do kontrolowania poprawności procesu ekstrakcji kwasów nukleinowych oraz prawidłowego przebiegu reakcji Real Time PCR.

- 4.1 W probówce wolnej od nukleaz wymieszać następujące składniki:

RM	$(n + 3) \times 11 \mu\text{L}$
RT	$(n + 3) \times 0,2 \mu\text{L}$
Rin	$(n + 3) \times 0,4 \mu\text{L}$
Woda	$(n + 3) \times (8,4 - x) \mu\text{L}$

- 4.2 Do **n + 2** probówek reakcyjnych nanieść po $(20 - x) \mu\text{L}$ mieszaniny przygotowanej w punkcie 4.1

- 4.3 Do **n** probówek reakcyjnych dodać po **x** μL przygotowanych preparatów RNA. Do jednej z pozostałych dwóch probówek reakcyjnych dodać **x** μL składnika **NC** (kontrola negatywna), a do drugiej **x** μL składnika **PC** (kontrola pozytywna). Następnie przejść do punktu 5.

WARIANT II: Kontrola wewnętrzna nie została dodana do próbki podczas procesu ekstrakcji RNA.

UWAGA 8. Należy postąpić według wariantu II, jeżeli system kontroli wewnętrznej jest wykorzystywany wyłącznie do kontrolowania prawidłowego przebiegu reakcji Real Time PCR.

- 4.1 W probówce wolnej od nukleaz wymieszać następujące składniki:

RM	$(n + 3) \times 11 \mu\text{L}$
RT	$(n + 3) \times 0,2 \mu\text{L}$
Rin	$(n + 3) \times 0,4 \mu\text{L}$
Woda	$(n + 3) \times (7,9 - x) \mu\text{L}$

- 4.2 Do **n + 2** probówek reakcyjnych nanieść po $(19,5 - x) \mu\text{L}$ przygotowanej mieszaniny.

- 4.3 Do **n** probówek reakcyjnych nanieść **x** μ L przygotowanych preparatów RNA oraz **0,5** μ L składnika **IC** (kontrola wewnętrzna).
- 4.4 Do jednej z pozostałych dwóch probówek dodać (**x + 0,5**) μ L składnika **NC** (kontrola negatywna), a do drugiej (**x + 0,5**) μ L składnika **PC** (kontrola pozytywna). Następnie przejść do punktu 5.
5. Zamknąć probówki reakcyjne, a następnie krótko je zwirować.
6. Probówki reakcyjne umieścić w urządzeniu przeprowadzenia reakcji Real Time PCR i wykonać reakcję zgodnie z temperaturowym profilem reakcji.

Etap	Temperatura	Czas	Odczyt fluorescencji	Ilość cykli
Odwrotna transkrypcja	45 °C	15 min		1
Denaturacja wstępna	95 °C	5 min		1
Denaturacja	95 °C	10 s	FAM i HEX	} 45
Amplifikacja	58 °C	25 s		

UWAGA 9. Kanał dla **FAM** służy do wykrywania sekwencji specyficznych dla **TBEV**. Kanał dla **HEX** służy do wykrywania **kontroli wewnętrznej**.

UWAGA 10. Zaleca się, aby czynności związane z nastawieniem reakcji Real Time PCR wykonywać w komorze laminarnej, celem ograniczenia ryzyka zanieczyszczenia probówek reakcyjnych.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Prawidłowy wynik reakcji Real Time PCR przedstawiono w tabeli poniżej:

Rodzaj próbki	FAM	HEX	Wynik
Kontrola pozytywna	+	-	Prawidłowy
Kontrola negatywna	-	+	Prawidłowy
Oznaczenie 1	+	+	Dodatni
Oznaczenie 2	+	-	Dodatni
Oznaczenie 3	-	+	Ujemny

+ oznacza amplifikację produktu PCR rejestrowaną jako wzrost fluorescencji z $Cq \leq 40$

- oznacza brak amplifikacji produktu PCR i brak wzrostu fluorescencji lub amplifikację ze wzrostem fluorescencji z $Cq > 40$

Wynik określany jako **dodatni** potwierdza obecność sekwencji specyficznych dla TBEV w badanej próbce. Wynik **ujemny** oznacza brak obecności lub obecność poniżej granicy wykrywalności, sekwencji specyficznych dla TBEV w badanej próbce.

UWAGI DODATKOWE

- Zastosowane sondy TaqMan® posiadają tzw. ciemne wygaszacze (dark quenchers), które nie generują dodatkowych sygnałów fluorescencyjnych. W urządzeniach do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR, które tego wymagają (np. RotorGene 6000), jako typ wygaszacza należy wybrać opcję „none”.
- Urządzenie do przeprowadzania reakcji Real Time PCR powinno posiadać kalibrację (tzw. Kompensację kolorów) dla barwników fluorescencyjnych wykorzystywanych w zestawie.
- Zestaw **AmpliTest TBEV (Real Time PCR)** został zoptymalizowany do przeprowadzenia reakcji w objętości 20 μ L. Zmiana objętości reakcji może istotnie wpłynąć na niektóre parametry testu, w tym na osiągnięty limit detekcji.

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- Należy zachować szczególną ostrożność podczas ekstrakcji RNA. Materiał biologiczny uzyskany od kleszczy oraz ludzi traktować jako **potencjalnie skażony**.
- Ekstrakcję RNA oraz detekcję obecności TBEV powinien wykonać odpowiednio przeszkolony personel w laboratorium spełniającym odpowiednie wymogi i dopuszczonym do pracy ze skażonym materiałem biologicznym. Należy zwrócić szczególną uwagę, aby podczas ekstrakcji RNA nie doszło do krzyżowego zanieczyszczenia preparatów RNA ekstrahowanych równolegle.
- Uzyskany preparat RNA chronić przed działaniem nukleaz (stosować odpowiednio certyfikowane materiały wolne od nukleaz). Preparat RNA należy przechowywać w postaci zamrożonej. Należy unikać jego wielokrotnego zamrażania i rozmrażania.
- W celu zwiększenia stabilności RNA, można używać preparatów poprawiających stabilność RNA i hamujących działanie nukleaz.
- W celu maksymalnego wyeliminowania fałszywych wyników należy przestrzegać następujących zasad:
 - w miarę możliwości wyznaczyć osobne stanowiska do ekstrakcji RNA, przygotowania reakcji Real Time PCR oraz jej wykonania/analizy;
 - zmieniać odzież ochronną (fartuch laboratoryjny, rękawice jednorazowe) pomiędzy etapami ekstrakcji RNA oraz przygotowania reakcji Real Time PCR;
 - powierzchnie stanowisk roboczych należy przemywać środkami usuwającymi/niszczącymi RNA;
 - należy stosować jedynie sterylne końcówki z filtrem dedykowane do pipet automatycznych;
 - podczas przygotowywania reakcji Real Time PCR, składnik **PC** należy dodać jako **ostatni**. Przed jego dodaniem, w miarę możliwości, należy zamknąć probówki z dodanymi preparatami RNA oraz składnikiem **NC**;
- Podczas pracy z zestawem nie wolno jeść, pić, ani palić papierosów.
- Należy umyć ręce bezpośrednio po zakończeniu pracy z zestawem.
- W przypadku bezpośredniego kontaktu składników zestawu ze skórą lub oczami, należy przemyć te miejsca obficie wodą.
- Zaleca się, aby zestawy z przekroczonym terminem ważności lub niewykorzystane składniki zestawu były utylizowane jak laboratoryjne odpady jednorazowego użytku.

ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW

Przebieg reakcji Real Time PCR

Zaistniały problem	Zaistniały problem		Prawdopodobna przyczyna	Rozwiązanie problemu
	FAM	HEX		
Nieprawidłowy odczyt fluorescencji dla kontroli pozytywnej	-	+	Dodano do probówki reakcyjnej składnik NC zamiast PC .	Powtórzyć reakcję dla kontroli pozytywnej.
	-	-	Nie dodano składnika PC lub składnik RM jest złej jakości.	Powtórzyć reakcję dla kontroli pozytywnej. W przypadku otrzymania ponownie wyniku nieprawidłowego należy założyć złą jakość składnika RM (niewłaściwe przechowywanie, niewłaściwe warunki transportu, przekroczenie terminu ważności).
Nieprawidłowy odczyt fluorescencji	+	+	Kontaminacja składnika RM lub NC .	Powtórzyć reakcję dla kontroli negatywnej, używając innej probówki ze składnikiem NC .

Zaistniały problem		Prawdopodobna przyczyna	Rozwiązanie problemu
FAM	HEX		
dla kontroli negatywnej			W przypadku otrzymania ponownie wyniku nieprawidłowego należy przyjąć, że doszło do kontaminacji składnika RM lub NC .
	+	-	Dodano do próbki reakcyjnej składnik PC zamiast NC .
	-	-	Nie dodano składnika NC lub składnik RM jest złej jakości.
Nieprawidłowy odczyt fluorescencji dla badanej próbki	-	-	Nie dodano kontroli wewnętrznej IC na jednym z etapów wykonywanego badania.
			Niska wydajność ekstrakcji RNA i/lub obecne inhibitory reakcji Real Time PCR Zbyt duże stężenie preparatu RNA Zła jakość składnika RM .
			Ustalić, czy dodano kontroli wewnętrznej IC na założonym etapie wykonywania testu. Powtórzyć reakcję Real Time PCR z dodaną kontrolą wewnętrzną.
			Zmierzyć stężenie preparatu RNA i w razie konieczności powtórzyć reakcję z mniejszą ilością RNA dodanego do reakcji. Przy dalszym braku amplifikacji na kanale HEX dla badanych preparatów RNA oraz dla reakcji pozytywnej i negatywnej założyć złą jakość składnika RM . Przy amplifikacji na kanale HEX dla kontroli negatywnej oraz braku amplifikacji na kanale HEX dla badanych preparatów RNA, założyć zanieczyszczenie preparatu RNA inhibitorami reakcji PCR lub niską wydajność ekstrakcji kwasów nukleinowych.

Proces ekstrakcji kwasów nukleinowych.

Zaistniały problem	Prawdopodobna przyczyna	Rozwiązanie problemu
Istotnie wyższe wartości C_q uzyskiwane na kanale HEX dla badanych próbek w porównaniu z wartością C_q uzyskaną dla kontroli negatywnej ($\Delta C_q > 2$)	Niska wydajność ekstrakcji RNA z badanej próbki.	W celu ustalenia przyczyn niskiej wydajności ekstrakcji RNA należy skontaktować się z producentem zastosowanego zestawu do ekstrakcji kwasów nukleinowych.

OBSŁUGA KLIENTA

- Wszelkie problemy i nieprawidłowości, które pojawiły się podczas użytkowania zestawu diagnostycznego można zgłaszać telefonicznie lub drogą mailową.
- Zamówienia na zestawy **AmpliTest (Real Time PCR)** można składać drogą mailową.

KONTAKT

Obsługa klienta

+48 739 223 268
contact@amplicon.pl