

Czerwiec 2016

# Zestaw *virotype*<sup>®</sup> BTV pan/4 RT-PCR - Instrukcja obsługi



24 (nr katalogowy 280453)



96 (nr katalogowy 280455)

Do oznaczania RNA wirusa choroby  
niebieskiego języka (BTV) i serotypu 4 BTV

Niemiecka instrukcja obsługi jest dopuszczona zgodnie z § 11 (2)  
Nr rejestracji: FLI-C 020

**REF**

280453, 280455



QIAGEN Leipzig GmbH, Deutscher Platz 5b,  
04103 Leipzig, Niemcy

---

# Spis treści

|   |    |
|---|----|
| Zawartość zestawu .....   | 3  |
| Przeznaczenie .....   | 3  |
| Symbole .....   | 4  |
| Przechowywanie .....  | 5  |
| Informacje dotyczące bezpieczeństwa .....   | 5  |
| Kontrola jakości .....  | 6  |
| Wprowadzenie .....  | 7  |
| Zasada testu .....  | 7  |
| Ekstrakcja RNA .....  | 8  |
| Dodatkowo wymagane materiały .....  | 10 |
| Ważne informacje .....  | 11 |
| Ogólne środki ostrożności .....   | 11 |
| Kontrola negatywna .....  | 11 |
| Kontrola pozytywna .....  | 12 |
| Kontrola ekstrakcji i amplifikacji .....  | 12 |
| Protokół: Real-time RT-PCR w przypadku stosowania Rotor-Gene Q .....                                    | 13 |
| Protokół: Real-time RT-PCR w przypadku stosowania 96-dółkowego urządzenia<br>płytkowego real-time ..... | 17 |
| Ocena .....   | 20 |
| Rozwiązywanie problemów .....   | 24 |
| Informacje dla zamawiających .....  | 25 |

## Zawartość zestawu

| <b><i>virotype</i> BTV pan/4 RT-PCR Kit</b>  | <b>(24)</b>   | <b>(96)</b>   |
|--|---------------|---------------|
| <b>Nr katalogowy</b>   | <b>280453</b> | <b>280455</b> |
| <b>Liczba reakcji</b>  | <b>24</b>     | <b>96</b>     |
| Master Mix (Master Mix, próbówka z pomarańczowym wieczkiem), zawiera enzymy, primery i sondy | 1 x 500 µl    | 2 x 980 µl    |
| Positive Control (kontrola pozytywna, próbówka z czerwonym wieczkiem)                        | 1 x 25 µl     | 1 x 70 µl     |
| Negative Control (kontrola negatywna, próbówka z niebieskim wieczkiem)                       | 1 x 25 µl     | 1 x 70 µl     |
| Instrukcja obsługi   | 1             | 1             |











## Przeznaczenie

Zestaw *virotype* BTV pan/4 RT-PCR jest zestawem real-time Multiplex RT-PCR do oznaczania RNA wirusa choroby niebieskiego języka w próbkach bydła, owiec i kóz. Zestaw umożliwia oznaczenie czynnika zakaźnego w krwi pełnej (próbki pojedyncze lub puli) i próbkach tkanek (śledziona, węzły chłonne). Zestaw testowy umożliwia oznaczenie wszystkich znanych serotypów wirusa choroby niebieskiego języka (BTVpan), serotypu 4 BTV (BTV-4) oraz kontroli ekstrakcji i amplifikacji.

Zestaw jest dopuszczony przez Instytut im. Friedricha Loefflera zgodnie z § 11 niemieckiej ustawy TierGesG o numerze rejestracyjnym FLI-C 020.

**Tylko do użytku weterynaryjnego.**

## Symbole

|   |   |
|---|---|
|  <N> | Zestaw zawiera odczynniki wystarczające do przeprowadzenia <N> testów |
|      | Producent   |
|      | Numer serii   |
|      | Termin ważności   |
|     | Zakres temperatur podczas przechowywania                              |
|    | Instrukcja obsługi  |
|    | Numer katalogowy  |
|    | Numer materiału   |
|    | Chronić przed światłem  |
|    | Do próbek pobranych od bydła, owiec i kóz                             |

## Przechowywanie

Składniki zestawu *virotype* BTV pan/4 RT-PCR należy przechowywać w temperaturze od  $-30^{\circ}\text{C}$  do  $-15^{\circ}\text{C}$  –w takich warunkach przechowywania zachowują przydatność do użycia do terminu ważności podanego na etykiecie. Należy unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania ( $>2x$ ), ponieważ może to zmniejszyć czułość testu. Jeśli składniki zestawu są używane tylko sporadycznie, należy je zamrozić po uprzednim podzieleniu na mniejsze części.

## Informacje dotyczące bezpieczeństwa

Podczas pracy z substancjami chemicznymi należy nosić fartuch laboratoryjny, jednorazowe rękawiczki i okulary ochronne. Więcej informacji można znaleźć w odpowiednich kartach charakterystyki substancji (safety data sheets, SDS). W naszej bibliotece kart charakterystyki substancji na stronie internetowej **[www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)** można znaleźć SDS każdego zestawu QIAGEN i każdego składnika zestawu w formacie PDF, które można przeglądać i drukować.

Wszystkie pozostałości próbek oraz przedmioty mające styczność z próbkami należy usuwać lub poddawać dekontaminacji jako materiały potencjalnie zakaźne.

---

## Kontrola jakości

Zgodnie z posiadającym certyfikat ISO systemem zarządzania jakością firmy QIAGEN każda seria zestawu *virotype* BTV pan/4 RT-PCR jest testowana według określonych kryteriów kontrolnych w celu zagwarantowania spójnej jakości produktów.

# Wprowadzenie

Choroba niebieskiego języka (ang. Bluetongue Disease) jest niezaraźliwą chorobą zakaźną, występującą u przeżuwaczy. Czynnikiem zakaźnym jest wirus choroby niebieskiego języka (ang. Bluetongue Virus, BTV), dwuniciowy wirus RNA z rodzaju *Orbivirus* z rodziny *Reoviridae*, występujący w co najmniej 27 znanych serotypach. Wirus jest rozpowszechniony na całym świecie. Choroba występuje przede wszystkim u owiec, bydła i kóz. U owiec objawy są z reguły bardziej wyraźne. W ciężkich przypadkach może dojść do obrzęku i zabarwienia języka na niebiesko (bluetongue).

Serotyp 4 BTV ma specjalne znaczenie epidemiologiczne w Europie i jest odpowiedzialny za wybuchy choroby niebieskiego języka w ostatnim czasie. Zaraza zwierząt jest przenoszona przez określone owady kłujące z rodzaju *Culicoides* (kuczmany). Oprócz tego wirus może być przenoszony także przez zanieczyszczone igły podczas zabiegów i pobierania krwi.

## Zasada testu

Podczas oznaczania patogenów za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) przeprowadzana jest amplifikacja swoistych obszarów z genomu patogenu. W przypadku real-time RT-PCR powstały produkt amplifikacji jest wykrywany za pomocą barwników fluorescencyjnych. Są one z reguły sprzężone z sondami oligonukleotydowymi, które wiążą się swoiście z produktem amplifikacji. Obserwacja przebiegu intensywności fluorescencji podczas PCR (w czasie rzeczywistym, dlatego

„real-time PCR“) umożliwia oznaczenie gromadzącego się produktu bez konieczności ponownego otwarcia próbek.

Zestaw *virotype* BTV pan/4 RT-PCR zawiera wszystkie odczynniki niezbędne do oznaczenia RNA BTV, łącznie z kontrolą pozytywną i negatywną. Zestaw ten umożliwia przeprowadzenie odwrotnej transkrypcji i PCR w jednej próbce, co zmniejsza ryzyko skażenia.

W zestawie *virotype* BTV pan/4 RT-PCR Kit stosowane są trzy kombinacje primerów i sond: jedna do RNA dotychczas znanych 27 serotypów BTV (sygnał fluorescencyjny FAM™), jedna do RNA serotypu 4 BTV (sygnał fluorescencyjny Cy5™) i jedna do genu „housekeeping” obecnego w sondzie (sygnał fluorescencyjny mRNA β-aktyny, HEX™).

Kontrola pozytywna zawiera RNA BTV-4 *in vitro* (sygnał fluorescencyjny Cy5) i dwuniciowe RNA BTV-8 (sygnał fluorescencyjny FAM). Detekcja sygnału fluorescencyjnego FAM umożliwia kontrolę etapu denaturacji, ponieważ tylko w przypadku skutecznej denaturacji wirusowego, dwuniciowego RNA możliwe jest przeprowadzenie skutecznej amplifikacji.

## Ekstrakcja RNA

Zestaw *virotype* BTV pan/4 RT-PCR nadaje się do oznaczania RNA BTV w krwi pełnej (najlepiej z dodanymi antykoagulantami, np. krew EDTA) i w próbkach tkanek (śledziona, węzły chłonne) przeżuwaczy. Ze względu na dużą czułość zestawu testowego możliwe jest badanie próbek krwi w pulach składających się z



---

maksymalnie 10 próbek pojedynczych. Optymalna wielkość puli jest jednak zależna od prewalencji BTV w badanym obszarze.

Przed real-time RT-PCR konieczne jest przeprowadzenie ekstrakcji RNA wirusa z materiału wyjściowego. Firma QIAGEN oferuje szereg różnych produktów do ekstrakcji RNA z próbek pobranych od zwierząt.

- Zestaw QIAamp<sup>®</sup> *cador*<sup>®</sup> Pathogen Mini
- Zestaw MagAttract<sup>®</sup> 96 *cador* Pathogen
- Zestaw QIAamp Viral RNA Mini
- Zestaw RNeasy<sup>®</sup> Fibrous Tissue Mini do tkanek
- Zestaw RNeasy Mini

Jeśli real-time RT-PCR nie jest przeprowadzana bezpośrednio po ekstrakcji, RNA należy przechowywać w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  lub w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$  przez dłuższy czas.

W przypadku zestawów na bazie kolumn wirowych możliwa jest automatyczna ekstrakcja RNA za pomocą QIAcube<sup>®</sup>.

## Dodatkowo wymagane materiały

Podczas pracy z substancjami chemicznymi należy nosić fartuch laboratoryjny, jednorazowe rękawiczki i okulary ochronne. Więcej informacji można znaleźć w odpowiednich kartach charakterystyki substancji (safety data sheets, SDS), które można otrzymać od poszczególnych producentów.

- Pipety
- Końcówki pipet bez nukleaz, odporne na aerozole, z filtrem
- Sterylne probówki Eppendorf® o pojemności 1,5 ml
- Materiały eksploatacyjne bez nukleaz (bez RNazy/DNazy)
- Wirówka laboratoryjna z wirnikiem na probówki o pojemności 1,5 ml
- Chłodziarka lub lód
- Rotor-Gene® Q lub 96-dołkowy termocykler real-time z odpowiednimi kanałami fluorescencji
- Wersja oprogramowania Rotor-Gene Q 1.7.94 lub nowsza lub odpowiednie oprogramowanie do wybranego 96-dołkowego termocyklera płytkowego
- Paski i pokrywki PCR (do stosowania z Rotor-Gene Q (Strip Tubes and Caps, 0,1 ml, nr kat. 981103 lub 981106) lub optyczna 96-dołkowa mikro płytką z optyczną folią zamykającą lub pokrywką optyczną do wybranego 96-dołkowego termocyklera real-time

---

# Ważne informacje

## Ogólne środki ostrożności

Użytkownik powinien zawsze przestrzegać następujących informacji:

- Stosować końcówki pipet bez nukleaz, z filtrem.
- Materiał pozytywny (próbki, kontrole pozytywne lub produkty amplifikacji) należy przechowywać i przetwarzać oddzielnie od innych odczynników oraz dodawać do mieszaniny reakcyjnej w obszarze ograniczonym przestrzennie.
- Przed rozpoczęciem testu należy rozmrozić wszystkie składniki na lodzie.
- Po rozmrożeniu należy wymieszać składniki przez obracanie, a następnie krótko odwirować.
- Składników zestawu testowego nie należy stosować po upływie terminu ważności.
- Podczas przygotowania reakcji należy trzymać próbki i kontrole na lodzie lub w bloku chłodzącym.

## Kontrola negatywna

Do każdego cyklu PCR należy dołączać co najmniej jedną kontrolę negatywną. Umożliwia to wykrycie wszelkich zanieczyszczeń podczas reakcji.

---

## Kontrola pozytywna

W przypadku analiz PCR nieznanymi próbek zalecane jest dołączenie do PCR kontroli pozytywnej, czyli próbki, o której wiadomo, że zawiera docelowe RNA wirusa. Kontrola pozytywna służy do udowodnienia funkcjonalności testu na obecność patogenu, czyli na przykład prawidłowego przygotowania mieszaniny reakcyjnej. W celu sprawdzenia skutecznej amplifikacji sekwencji docelowej należy zastosować 5 µl kontroli pozytywnej dostarczonej w zestawie *virotype* BTV pan/4 RT-PCR.

## Kontrola ekstrakcji i amplifikacji

Dodatkowe bezpieczeństwo procedury i przyjazność dla użytkownika są zagwarantowane poprzez kontrolę wewnętrzną, dołączoną w postaci kolejnego zestawu primera i sondy. Umożliwia ona oznaczenie występującego w próbce genu „housekeeping”. Dzięki temu możliwa jest kontrola ekstrakcji oraz amplifikacji.

---

# Protokół: Real-time RT-PCR w przypadku stosowania Rotor-Gene Q

## Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Przed rozpoczęciem należy przeczytać punkt „Ważne informacje” na stronie 11 i nast.
- Do każdego cyklu PCR należy dołączać co najmniej jedną kontrolę pozytywną (Positive Control) i jedną kontrolę negatywną (Negative Control).
- Przed rozpoczęciem należy przeczytać cały protokół i upewnić się, że użytkownik jest zaznajomiony z obsługą wybranego cyklera real-time PCR.
- RNA jest niestabilne. Protokół należy wykonywać bez przerw.

## Przygotowania

- Wszystkie odczynniki należy rozmrozić na lodzie, chroniąc przed światłem.
- Podczas przygotowywania PCR należy trzymać wszystkie odczynniki na lodzie.
- Przed użyciem należy krótko odwirować odczynniki.

## Wykonanie

1. Odmierzyć pipetą co najmniej 7 µl próbek RNA lub kontroli pozytywnej do poszczególnych probówek PCR o pojemności 0,2 ml. Zamknąć probówki (np. przy użyciu PCR sealing foil). Należy wykonać również kontrolę pozytywną i negatywną.

Kontrola pozytywna: Zamiast próbki RNA zastosować co najmniej 7  $\mu\text{l}$  kontroli pozytywnej (Positive Control).

2. Próbkę poddać denaturacji przez 5 minut w temperaturze  $98^{\circ}\text{C}$  w 96-dołkowym standardowym urządzeniu do PCR z ogrzewaną pokrywą.
3. Natychmiast schłodzić w wodzie z lodem lub płynnym azocie przez co najmniej 20 sekund.
4. Odmierzyć pipetą 5  $\mu\text{l}$  każdej próbki RNA, kontroli pozytywnej i negatywnej oddzielnie do poszczególnych probówek PCR o pojemności 0,1 ml, które nadają się do stosowania z Rotor-Gene Q.
5. Odmierzyć pipetą 20  $\mu\text{l}$  mieszaniny Master Mix do każdej probówki. Objętość końcowa wynosi tym samym 25  $\mu\text{l}$  (Tabela 1).

**Tabela 1. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej**

| <b>Składnik</b>           | <b>Objętość</b>  |
|---------------------------|------------------|
| Master Mix                | 20 $\mu\text{l}$ |
| Próbka                    | 5 $\mu\text{l}$  |
| <b>Objętość całkowita</b> | 25 $\mu\text{l}$ |

6. Zamknąć probówki odpowiednimi wieczkami.
7. W oprogramowaniu termocyklera ustawić filtry dla reportera zgodnie z tabelą 2. W Rotor-Gene Q wybrać zielony, czerwony i żółty kanał.

**Tabela 2. Ustawienia filtra reportera w Rotor-Gene Q**

| <b>Patogen/Kontrola wewnętrzna</b> | <b>Reporter</b> |
|------------------------------------|-----------------|
| BTV pan                            | <b>FAM</b>      |
| BTV-4                              | <b>Cy5</b>      |
| Kontrola wewnętrzna                | HEX/JOE™*       |

\* Należy zastosować ustawienie odpowiednie dla posiadanego urządzenia PCR.

8. W przypadku używania tylko zestawu *virotype* BTV pan/4 RT-PCR należy wykorzystać przedstawiony w tabeli 3 protokół real-time RT-PCR.

**Tabela 3. Protokół real-time RT-PCR dla BTV pan/4**

| <b>Temperatura</b> | <b>Czas</b> | <b>Liczba cykli</b> |
|--------------------|-------------|---------------------|
| 50°C               | 10 min      | 1                   |
| 95°C               | 10 min      | 1                   |
| 95°C               | 15 s        | 40                  |
| 60°C†              | 60 s        |                     |

†Rejestracja danych fluorescencji

9. W przypadku jednoczesnego przeprowadzania innych testów *virotype*- (np. *virotype* BVDV, *virotype* CSFV, *virotype* SBV i/lub *virotype* Influenza A), należy stosować protokół real-time RT-PCR przedstawiony w tabeli 4.

**Tabela 4. Protokół real-time RT-PCR dla kilku jednocześnie wykonywanych testów *virotype***

| <b>Temperatura</b> | <b>Czas</b> | <b>Liczba cykli</b> |
|--------------------|-------------|---------------------|
| 50°C               | 20 min      | 1                   |
| 95°C               | 15 min      | 1                   |
| 95°C               | 30 s        |                     |
| 57°C*              | 45 s        | 40                  |
| 68°C               | 45 s        |                     |

\* Rejestracja danych fluorescencji.



# Protokół: Real-time RT-PCR w przypadku stosowania 96-dołkowego urządzenia płytkowego real-time

Przed rozpoczęciem należy przeczytać punkt „Ważne informacje” na stronie 11 i nast. oraz „Ważne informacje przed rozpoczęciem” i Przygotowania na stronie 13.

## Wykonanie

1. Odmierzyć pipetą 5  $\mu$ l próbek RNA, kontroli pozytywnej i negatywnej do poszczególnych probówek. Zamknąć probówki (np. przy użyciu PCR sealing foil).  
Należy wykonać również kontrolę pozytywną i negatywną.  
Kontrola pozytywna: Zamiast próbki RNA zastosować 5  $\mu$ l kontroli pozytywnej (Positive Control).  
Kontrola negatywna: Zamiast próbki RNA zastosować 5  $\mu$ l kontroli negatywnej (Negative Control).
2. Próbki poddać denaturacji przez 5 minut w temperaturze 98°C w 96-dołkowym standardowym urządzeniu do PCR z ogrzewaną pokrywą.
3. Natychmiast schłodzić w wodzie z lodem lub płynnym azocie przez co najmniej 20 sekund. Próbki po denaturacji należy trzymać na lodzie lub w bloku chłodzącym.
4. Odmierzyć pipetą 20  $\mu$ l mieszaniny Master Mix do każdej probówki. Objętość końcowa wynosi tym samym 25  $\mu$ l (Tabela 5).

**Tabela 5. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej**

| <b>Składnik</b>           | <b>Objętość</b>             |
|---------------------------|-----------------------------|
| Master Mix                | 20 $\mu$ l                  |
| Próbka                    | 5 $\mu$ l                   |
| <b>Objętość całkowita</b> | <b>25 <math>\mu</math>l</b> |

5. Zamknąć próbki odpowiednimi wieczkami.
6. W oprogramowaniu termocyklera ustawić filtry dla reportera zgodnie z tabelą 6.

**Tabela 6. Ustawienia filtra reportera**

| <b>Patogen/Kontrola wewnętrzna</b> | <b>Reporter</b> |
|------------------------------------|-----------------|
| BTV pan                            | <b>FAM</b>      |
| BTV-4                              | <b>Cy5</b>      |
| Kontrola wewnętrzna                | HEX/JOE*        |
| Odniesienie pasywne <sup>†</sup>   | ROX             |

\* Należy zastosować ustawienie odpowiednie dla posiadanego urządzenia PCR.

<sup>†</sup>Odniesienie wewnętrzne ABI PRISM<sup>®</sup> Sequence Detection System firmy Applied Biosystems<sup>®</sup>

7. W przypadku używania tylko zestawu *virotype* BTV pan/4 RT-PCR należy wykorzystać przedstawiony w tabeli 7 protokół real-time RT-PCR.

**Tabela 7. Protokół real-time RT-PCR dla BTV pan/4**

| Temperatura | Czas   | Liczba cykli |
|-------------|--------|--------------|
| 50°C        | 10 min | 1            |
| 95°C        | 10 min | 1            |
| 95°C        | 15 s   | 40           |
| 60°C*       | 60 s   |              |

\* Rejestracja danych fluorescencji

8. W przypadku jednoczesnego przeprowadzania innych testów virotype (np. *virotype* PRRSV, *virotype* BVDV, *virotype* CSFV, *virotype* SBV i/lub *virotype* Influenza A), należy stosować protokół real-time RT-PCR przedstawiony w tabeli 8.

**Tabela 8. Protokół real-time RT-PCR dla kilku jednocześnie wykonywanych testów *virotype***

| Temperatura       | Czas   | Liczba cykli |
|-------------------|--------|--------------|
| 50°C              | 20 min | 1            |
| 95°C              | 15 min | 1            |
| 95°C              | 30 s   | 40           |
| 57°C <sup>†</sup> | 45 s   |              |
| 68°C              | 45 s   |              |

<sup>†</sup> Rejestracja danych fluorescencji.

# Ocena

## Interpretacja wyników

W celu uznania pomiaru za ważny sygnał fluorescencyjny kanału FAM, Cy5 i HEX dla kontroli pozytywnej musi mieć w każdym przypadku wartość  $C_T^*$  mniejszą niż 35 ( $C_T < 35$ ). Jeśli dla kontroli pozytywnej nie będzie wykryty sygnał FAM lub wykryta będzie wartość  $C_T \leq 35$  w kanale FAM, oznacza to, że etap denaturacji lub etap chłodzenia były niewystarczające. W takim przypadku konieczne jest powtórzenie testu. Kontrola negatywna nie może wykazywać sygnału.

Podczas pracy z nieznanymi próbkami możliwe są poniżej opisane wyniki. Podsumowanie możliwych wyników próbek można znaleźć również w tabeli 9 na stronie 22.

**Wynik testu jest pozytywny dla BTV i BTV-4 oraz test jest ważny, jeśli spełnione są następujące kryteria:**

- Próbka wykazuje sygnał w kanałach FAM, Cy5 i HEX<sup>†</sup>.
- Kontrola pozytywna wykazuje sygnał we wszystkich kanałach.
- Kontrola negatywna nie wykazuje żadnego sygnału.

\*  $C_T$ , Threshold cycle (cykl progowy) — cykl, w którym krzywa amplifikacji przekracza wartość progową, od której wykrywalny jest po raz pierwszy wyraźny wzrost fluorescencji.

<sup>†</sup> Na Rotor-Gene Q zielony i żółty.

---

W przypadku bardzo wysokich stężeń wyjściowych RNA BTV w próbce może wystąpić słabszy sygnał HEX lub jego braku wskutek konkurencji z kontrolą wewnętrzną.

**Wynik testu jest pozytywny dla BTV i negatywny dla BTV-4 oraz test jest ważny, jeśli spełnione są następujące kryteria:**

- Próbkę wykazuje sygnał w kanale FAM i kanale HEX, ale brak sygnału w kanale Cy5.
- Kontrola pozytywna wykazuje sygnał we wszystkich kanałach.
- Kontrola negatywna nie wykazuje żadnego sygnału.

W przypadku bardzo wysokich stężeń wyjściowych RNA BTV w próbce może wystąpić słabszy sygnał HEX lub jego braku wskutek konkurencji z kontrolą wewnętrzną.

**Wynik testu jest negatywny dla BTV i BTV-4 oraz test jest ważny, jeśli spełnione są następujące kryteria:**

- Próbkę wykazuje sygnał tylko w kanale HEX.
- Kontrola pozytywna wykazuje sygnał we wszystkich kanałach.
- Kontrola negatywna nie wykazuje żadnego sygnału.

Pozytywny sygnał fluorescencyjny HEX wyklucza możliwość inhibicji PCR lub nieprawidłowej ekstrakcji RNA, ponieważ amplifikacja kontroli wewnętrznej była przeprowadzona z powodzeniem.

## Wyniki diagnostyczne są nierozstrzygające w przypadku następującej sytuacji:

- Próbka nie wykazuje sygnału w żadnym z kanałów fluorescencji.

Doszło do zahamowania PCR lub ekstrakcja próbki była wykonana nieprawidłowo. Zalecamy ponowne przeanalizowanie poszczególnych próbek pojedynczych w wodzie bez nukleaz (na przykład w rozcieńczeniu 1:5) lub powtórzenie ekstrakcji RNA lub całego testu ze świeżym materiałem próbki.

Sprawdzić, czy w przypadku kontroli pozytywnej (Positive Control) we wszystkich kanałach wykryto sygnał fluorescencyjny. Brak sygnału dla kontroli pozytywnej wskazuje na błąd, na przykład nieprawidłową denaturację RNA wirusa lub nieprawidłowe zaprogramowanie urządzenia PCR.

Powtórzyć ekstrakcję RNA lub całą procedurę ze świeżym materiałem próbki.

**Tabela 9. Tabela do interpretacji wyników\***

| Wynik próbki       | Reporter |     |     |
|--------------------|----------|-----|-----|
|                    | FAM      | Cy5 | HEX |
| BTV<br>pozytywny   | X        |     | (X) |
| BTV-4<br>pozytywny | X        | X   | (X) |
| negatywny          |          |     | X   |
| niejednoznaczny    |          |     |     |

---

\* Wyniki można odpowiednio interpretować, jeśli kontrola pozytywna i kontrola negatywna wykazują oczekiwane wyniki. Kontrola pozytywna musi wykazywać sygnał w kanałach FAM, Cy5 i HEX. Kontrola negatywna nie może wykazywać sygnału. Dokładne objaśnienie wszystkich możliwych wyników próbek można znaleźć również w punkcie „Ocena” na stronie 20 i nast.

---

## Rozwiązywanie problemów

Naukowcy w dziale pomocy technicznej firmy QIAGEN chętnie odpowiedzą na pytania dotyczące informacji i protokołów podanych w niniejszej instrukcji obsługi oraz ogólnie na temat technik przygotowania próbek i przeprowadzania testu (informacje kontaktowe można znaleźć na tylnej okładce i w Internecie na stronie **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**).



# Informacje dla zamawiających

| <b>Produkty</b>                            | <b>Zawartość</b>   | <b>Nr kat.</b> |
|--|--|----------------|
| <i>virotype</i> BTV pan/4 RT-PCR Kit (24)  | Na 24 reakcje: Master Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna          | 280453         |
| <i>virotype</i> BTV pan/4 RT-PCR Kit (96)  | Na 96 reakcji: Master Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna          | 280455         |
| <b>Produkty pokrewne</b>                   |  |                |
| <i>virotype</i> BTV pan/8 RT-PCR Kit (96)* | Na 96 reakcji: Master Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna          | 280445         |
| <i>virotype</i> SBV RT-PCR Kit (96)*       | Na 96 reakcji: Master Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna          | 281605         |
| <i>virotype</i> BVDV RT-PCR Kit (96)*      | Na 96 reakcji: PCR Mix, Enzyme Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna | 280375         |
| <i>bactotype</i> MAP PCR Kit (96)*         | Na 96 reakcji: Master Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna          | 285905         |
| <i>virotype</i> ASFV PCR Kit (96)*         | Na 96 reakcji: Master Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna          | 281905         |
| <i>virotype</i> CSFV RT-PCR Kit (96)*      | Na 96 reakcji: Master Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna          | 281805         |
| <i>virotype</i> PEDV/TGEV RT-PCR Kit (96)* | Na 96 reakcji: Master Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna          | 283605         |
| <i>virotype</i> PRRSV RT-PCR Kit (96)*     | Na 96 reakcji: Master Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna          | 282305         |

\* Zestaw jest dostępny również w innych wielkościach, patrz [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

| <b>Produkty</b>  | <b>Zawartość</b>   | <b>Nr kat.</b> |
|--|--|----------------|
| <i>virotype</i> Influenza A RT-PCR Kit (96)*                 | Na 96 reakcji: Master Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna  | 282605         |
| <i>bactotype</i> <sup>®</sup> Mycoplasma Mg/Ms PCR Kit (96)* | Na 96 reakcji: Master Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna  | 288105         |
| QIAamp <i>cador</i> Pathogen Mini Kit (50)*                  | Na 50 preparacji: 50 kolumn wirowych QIAamp Mini, Carrier-RNA, proteinaza K, Collection Tubes (2 ml), bufor bez RNazy  | 54104          |
| QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)*                              | Na 50 preparacji RNA: 50 kolumn wirowych QIAamp Mini, Carrier-RNA, Collection Tubes (2 ml), bufor bez RNazy  | 52904          |
| MagAttract <sup>®</sup> 96 <i>cador</i> Pathogen Kit (384)   | Na 384 preparacji: Pokrywa 96-dółkowa, bloki S, MagAttract Suspension G, bufor i odczynniki  | 947457         |
| RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (50)                          | Na 50 preparacji: 50 kolumn wirowych RNeasy Mini, Collection Tubes (1,5 ml i 2 ml), proteinaza K, DNaza I bez RNazy, odczynniki i bufor bez RNazy                              | 74704          |
| RNeasy Mini Kit (50)*  | Na 50 preparacji: 50 kolumn wirowych RNeasy Mini, Collection Tubes (1,5 ml i 2 ml), odczynniki i bufor bez RNazy   | 74104          |
| Rotor-Gene Q 5plex Platform                                  | Cykler real-time PCR z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, ciemnoczerwony), laptop, oprogramowanie, wyposażenie dodatkowe, 1-rocza gwarancja na części i pracę | 9001570        |

\* Zestaw jest dostępny również w innych wielkościach, patrz [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

---

Firma QIAGEN oferuje różne zestawy ELISA oraz zestawy real-time PCR i real-time RT-PCR do oznaczania patogenów występujących w weterynarii. Więcej informacji o grupach produktów *bactotype*, *cador*<sup>®</sup>, *cattletype*<sup>®</sup>, *flocktype*<sup>®</sup>, *pigtype*<sup>®</sup> i *virotype* można znaleźć w Internecie na stronie **[www.qiagen.com/Animal-and-Veterinary-Testing](http://www.qiagen.com/Animal-and-Veterinary-Testing)**.

Aktualne informacje licencyjne i ograniczenia zastosowania poszczególnych produktów można znaleźć w odpowiednich instrukcjach obsługi zestawów lub urządzeń QIAGEN. Instrukcje obsługi zestawów i urządzeń QIAGEN są dostępne w Internecie na stronie

**[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)** lub można je otrzymać od działu pomocy technicznej firmy QIAGEN lub od lokalnego sprzedawcy.

## Ograniczona umowa użytkowania zestawu *virotype* BTV pan/4 RT-PCR

Używanie tego produktu oznacza wyrażenie zgody nabywcy i użytkownika produktu na następujące warunki:

1. Produkt wolno stosować wyłącznie zgodnie z udostępnionymi razem z produktem protokołami, niniejszą instrukcją obsługi oraz tylko razem ze składnikami dostarczonymi w zestawie. Firma QIAGEN nie udziela w ramach swoich praw własności żadnej licencji na stosowanie lub łączenie składników należących do tego zestawu z innymi składnikami, które nie należą do tego zestawu, za wyjątkiem przypadków opisanych w udostępnionych razem z produktem protokołach, niniejszej instrukcji obsługi oraz w dodatkowych protokołach dostępnych na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Niektóre z tych protokołów są udostępnione przez użytkowników dla innych użytkowników. Protokoły takie nie były w pełni przetestowane i zoptymalizowane przez firmę QIAGEN. Firma QIAGEN nie udziela gwarancji na te protokoły i nie przejmuje również odpowiedzialności, że nie naruszają one praw osób trzecich.
2. Poza wyraźnie wymienionymi zastosowaniami licencyjnymi firma QIAGEN nie gwarantuje, że niniejszy zestaw i/lub zastosowania przeprowadzane przy jego użyciu nie naruszają praw osób trzecich.
3. Niniejszy zestaw i jego składniki są przeznaczone do jednorazowego użycia i nie wolno ich ponownie używać, przygotowywać do ponownego użycia ani odsprzedawać.
4. Oprócz wyraźnie udzielonych licencji firma QIAGEN odrzuca wszelkie inne licencje, zarówno wyraźne, jak i dorozumiane.
5. Nabywca i użytkownik zestawu wyrażają zgodę, że nie będą podejmować ani nie dopuszczą innej osoby do podejmowania kroków, które mogłyby prowadzić do działań lub ułatwiać działania zakazane powyżej. Firma QIAGEN może dochodzić zakazów niniejszej Ograniczonej umowy użytkowania w sądzie w dowolnym miejscu, i uzyskać zwrot wszystkich kosztów dochodzeniowych i sądowych, w tym opłat adwokackich, poniesionych w ramach działań na rzecz dochodzenia warunków Ograniczonej umowy użytkowania lub jakichkolwiek swoich praw do własności intelektualnej dotyczącej zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki użytkowania i licencyjne można znaleźć w Internecie na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Zakup niniejszego produktu upoważnia nabywcę do wykorzystania produktu do amplifikacji i detekcji sekwencji kwasu nukleinowego do diagnostyki in vitro w weterynarii. Nie udziela się ogólnej licencji patentowej ani żadnej innej licencji, wykraczającej poza wyżej wymienione prawo nabywcy do użytkowania niniejszego produktu.

Znaki towarowe/nazwy handlowe: QIAGEN<sup>®</sup>, QIAamp<sup>®</sup>, QIAcube<sup>®</sup>, Sample to Insight<sup>®</sup>, *bactotype*<sup>®</sup>, *cador*<sup>®</sup>, *cattletype*<sup>®</sup>, DNeasy<sup>®</sup>, *flocktype*<sup>®</sup>, MagAttract<sup>®</sup>, *pigtype*<sup>®</sup>, RNeasy<sup>®</sup>, Rotor-Gene<sup>®</sup>, *virotype*<sup>®</sup> (QIAGEN Group); Applied Biosystems<sup>®</sup>, ABI PRISM<sup>®</sup>, FAM<sup>™</sup>, HEX<sup>™</sup>, JOE<sup>™</sup> (Life Technologies Corporation); Cy<sup>™</sup> (GE Healthcare); Eppendorf<sup>®</sup> (Eppendorf- AG). Nazwy handlowe lub znaki towarowe stosowane w niniejszej instrukcji obsługi nie mogą być traktowane jako prawnie niechronione, nawet jeżeli nie są oznakowane jako nazwy handlowe lub znaki towarowe.

HB-2054-001 © 2016 QIAGEN, wszystkie prawa zastrzeżone.

---

**Austria** • [techservice-at@qiagen.com](mailto:techservice-at@qiagen.com)

**Germany** • [techservice-de@qiagen.com](mailto:techservice-de@qiagen.com)

**Switzerland** • [techservice-ch@qiagen.com](mailto:techservice-ch@qiagen.com)

**[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**