

# Zestaw *virotype*<sup>®</sup> BTV pan/8 RT-PCR - Instrukcja obsługi



24 (nr katalogowy 280443)



96 (nr katalogowy 280445)



480 (nr katalogowy 280447)\*

Do wykrywania RNA wirusa choroby niebieskiego  
języka

Zatwierdzone zgodnie z § 17c niemieckiej Ustawy o chorobach zakaźnych zwierząt (FLI-B 539)



280443, 280445, 280447\*



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



\* Dostępne tylko na żądanie.

## **Technologie badań i oznaczeń firmy QIAGEN**

Firma QIAGEN jest czołowym dostawcą innowacyjnych technologii do badań i oznaczeń, umożliwiających izolację i wykrywanie zawartości dowolnych próbek biologicznych. Nasze zaawansowane produkty i usługi o wysokiej jakości zapewniają sukces na każdym etapie - od próbek po wyniki.

### **QIAGEN wyznacza standardy w następujących dziedzinach:**

- oczyszczanie DNA, RNA i białek
- oznaczanie kwasów nukleinowych i białek
- badania microRNA oraz iRNA
- automatyka technologii badań i oznaczania próbek

Naszą misją jest umożliwienie klientom osiągnięcia doskonałych i przełomowych wyników badań. Więcej informacji można znaleźć na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Ponadto firma QIAGEN oferuje wysokiej jakości, łatwe w użyciu i czułe rozwiązania molekularne do wykrywania patogenów weterynaryjnych i badań nad patogenami zwierzęcymi. Oferta produktów weterynaryjnych QIAGEN obejmuje szeroki wachlarz specyficznych dla patogenów testów PCR oraz rosnący wybór testów ELISA. Więcej informacji można znaleźć na stronie [www.qiagen.com/Animal-and-Veterinary-Testing](http://www.qiagen.com/Animal-and-Veterinary-Testing).

## Spis treści

<b>Zawartość zestawu</b>	4
<b>Przeznaczenie</b>	4
<b>Symbole</b>	7
<b>Przechowywanie</b>	7
<b>Informacje dotyczące bezpieczeństwa</b>	8
<b>Kontrola jakości</b>	8
<b>Wstęp</b>	9
Podstawy	9
Ekstrakcja RNA	10
<b>Sprzęt i odczynniki zapewniane przez użytkownika</b>	12
<b>Ważne informacje</b>	14
Ogólne środki ostrożności	14
Kontrola negatywna	14
Kontrola pozytywna	14
Kontrola ekstrakcji i amplifikacji	16
<b>Protokoły:</b>	
■ <b>Real-time RT-PCR przy użyciu Rotor-Gene Q</b>	<b>17</b>
■ <b>Real-time RT-PCR przy użyciu cyklera real-time na płytce 96-dołkowe</b>	<b>21</b>
<b>Analiza i interpretacja danych</b>	<b>24</b>
<b>Rozwiązywanie problemów</b>	<b>28</b>
<b>Dane do zamówień</b>	<b>29</b>

## Zawartość zestawu

Zestaw <i>virotype</i> BTV pan/8 RT-PCR	(24)	(96)	(480)
Nr katalogowy	280443	280445	280447*
Liczba reakcji	24	96	480
Master Mix (mieszanka Master Mix, próbówka z pomarańczowym wieczkiem) zawiera enzymy, primery i sondy	1 x 500 µl	2 x 980 µl	6 x 1625 µl
Positive Control (kontrola pozytywna, próbówka z czerwonym wieczkiem)	1 x 25 µl	1 x 70 µl	2 x 50 µl
Negative Control (kontrola negatywna, próbówka z niebieskim wieczkiem)	1 x 25 µl	1 x 70 µl	2 x 50 µl
Instrukcja obsługi	1	1	1

\* Dostępne tylko na żądanie

## Przeznaczenie

Zestaw *virotype* BTV pan/8 RT-PCR jest przeznaczony do wykrywania RNA wirusa choroby niebieskiego języka w krwi pełnej przeżuwaczy (najlepiej z antykoagulantami, np. krew z

EDTA) i próbkach tkanek (śledziona, węzły chłonne) pobranych od bydła, owiec i kóz. Zestaw jest zatwierdzony przez Instytut im. Friedricha Loefflera i zatwierdzony zgodnie z § 17c niemieckiej Ustawy o chorobach zakaźnych zwierząt (FLI-B 539) do stosowania w Niemczech do diagnostyki weterynaryjnej. Tylko do użytku weterynaryjnego.



## Symbole



Zawiera odczynniki do przeprowadzenia <N> testów



Legalny producent



Numer serii



Zużyć do



Zakres temperatur podczas przechowywania



Instrukcja obsługi



Numer katalogowy



Numer materiału



Chronić przed światłem



Do próbek bydła, owiec i kóz

## Przechowywanie

Składniki zestawu *virotype* BTV pan/8 RT-PCR należy przechowywać w temperaturze  $-15$  do  $-30^{\circ}\text{C}$ , w której pozostają stabilne do terminu przydatności podanego na etykiecie. Należy unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania ( $>2x$ ), ponieważ może to zmniejszyć czułość oznaczeń. Składniki należy zamrażać podzielone na porcje, jeśli będą używane tylko sporadycznie.

## **Informacje dotyczące bezpieczeństwa**

Podczas pracy z substancjami chemicznymi należy nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, jednorazowe rękawiczki i okulary ochronne. Więcej informacji można znaleźć w odpowiednich kartach charakterystyki substancji (SDS). Są one dostępne w Internecie w wygodnym i kompaktowym formacie PDF na stronie [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), gdzie można znaleźć, obejrzeć i wydrukować SDS dla wszystkich zestawów i składników zestawów QIAGEN.

Wszystkie pozostałości próbek i przedmioty mające styczność z próbkami należy poddać dekontaminacji lub usuwać jako potencjalnie zakaźny materiał.

## **Kontrola jakości**

Zgodnie z poświadczonym certyfikatem ISO systemem zarządzania jakością firmy QIAGEN każda seria zestawu *virotype* BTV pan/8 RT-PCR jest testowana pod kątem zgodności ze wstępnie określoną specyfikacją w celu zapewnienia spójnej jakości produktu.



## Wstęp

Choroba niebieskiego języka (bluetongue disease) jest zakaźną, niezaraźliwą chorobą przeżuwaczy. Czynnikiem chorobotwórczym jest wirus choroby niebieskiego języka (bluetongue virus, BTV), wirus o dwuniciowym RNA, należący do rodzaju *Orbivirus*, rodziny *Reoviridae*, obejmującej co najmniej 25 znanych serotypów. BTV jest szeroko rozpowszechniony na całym świecie. Choroba dotyczy głównie owiec, bydła i kóz. Wyraźne objawy kliniczne są zazwyczaj obserwowane tylko u owiec. W ciężkich przypadkach język może wykazywać intensywne przekrwienie i sinienie (niebieski język). BTV serotypu 8 ma znaczenie epidemiologiczne w Europie Środkowej oraz jest przyczyną ostatnich ognisk epidemicznych choroby niebieskiego języka. Wirus jest przenoszony przez określone muchówki z rodzaju *Culicoides* (kuczmany). Ponadto wirus może być przenoszony skażonymi igłami i narzędziami chirurgicznymi.

## Podstawy

Łańcuchowa reakcji polimerazy (PCR) opiera się na amplifikacji określonych regionów genomu patogenu. W przypadku RT-PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR, RT-PCR) namnożony produkt wykrywa się przy użyciu barwników fluorescencyjnych. Zwykle są one przyłączone do sond oligonukleotydowych, które wiążą się swoiście z namnożonym produktem. Monitorowanie natężenia fluorescencji podczas przebiegu reakcji PCR (tzn. w czasie rzeczywistym) pozwala na wykrycie gromadzącego się produktu bez potrzeby ponownego otwierania próbek.

Zestaw *virotype* BTV pan/8 RT-PCR zawiera wszystkie odczynniki potrzebne do wykrycia RNA wirusa BTV, w tym kontrolę pozytywną i negatywną. Przy użyciu tego zestawu możliwe jest wykonywanie odwrotnej transkrypcji i PCR w jednej próbce, co zmniejsza ryzyko skażenia.

Zestaw *virotype* BTV pan/8 RT-PCR wykorzystuje trzy specyficzne kombinacje primerów/sond: jedną dla RNA wszystkich 25 znanych serotypów BTV, wytwarzającą sygnał fluorescencyjny FAM™, jedną dla RNA BTV-8, wytwarzającą sygnał fluorescencyjny Cy5™, oraz jedną dla występującego w próbce genu metabolizmu podstawowego (tzw. housekeeping gene) ( $\beta$ -aktyna mRNA), wytwarzającą sygnał fluorescencyjny HEX™.

Kontrola pozytywna zawiera RNA BTV-8 i umożliwia kontrolę etapu denaturacji, ponieważ zakończona powodzeniem denaturacja dwuniciowego RNA wirusa jest warunkiem wstępnym dla amplifikacji.

## **Ekstrakcja RNA**

Zestaw *virotype* BTV pan/8 RT-PCR można stosować do wykrywania RNA wirusa BTV w krwi pełnej przeżuwaczy (najlepiej z antykoagulantami, np. krew z EDTA) i próbkach tkanek (śledziona, węzły chłonne). Ze względu na dużą czułość testu możliwa jest analiza puli składających się z maksymalnie 10 pojedynczych próbek krwi. Optymalna wielkość puli jest jednak zależna od częstości występowania BTV w danym regionie.

Przed real-time RT-PCR konieczna jest ekstrakcja RNA wirusa z materiału początkowego. Firma QIAGEN oferuje wybór produktów do ekstrakcji RNA z próbek zwierzęcych.

- Zestaw QIAamp® *cador*® Pathogen Mini
- Zestaw QIAamp Viral RNA Mini
- Zestaw do tkanek RNeasy® Fibrous Tissue Mini
- Zestaw RNeasy Mini

Jeśli badanie metodą real-time RT-PCR nie jest wykonywane natychmiast po ekstrakcji, RNA należy przechowywać w temperaturze -20°C lub w temperaturze -70°C w przypadku dłuższego przechowywania.

Ekstrakcję RNA przy użyciu zestawów opartych na metodzie kolumn wirowych można zautomatyzować stosując QIAcube®.

## **Sprzęt i odczynniki zapewniane przez użytkownika**

Podczas pracy z substancjami chemicznymi należy nosić odpowiedni fartuch laboratoryjny, jednorazowe rękawiczki i okulary ochronne. Dalsze informacje można znaleźć na odpowiednich kartach charakterystyki substancji (SDS), które są dostępne u dostawcy produktu.

- Pipety
- Niezawierające nukleaz, odporne na aerozole końcówki do pipet z filtrami
- Sterylne 1,5 ml probówki Eppendorf®
- Materiały eksploatacyjne niezawierające nukleaz (wolne od RNazy/DNazy) Należy zachować szczególną ostrożność w celu uniknięcia zanieczyszczenia nukleazą wszystkich odczynników i materiałów eksploatacyjnych używanych do ustawiania PCR do czulej identyfikacji kwasów nukleinowych wirusa.
- Urządzenie chłodzące i lód lub ciekły azot
- Standardowy cykler do PCR, na płytki 96-dołkowe
- Wirówka laboratoryjna z wirnikiem dla 1,5 ml probówek
- Rotor-Gene® Q lub real-time cykler na płytce 96-dołkowej z odpowiednimi kanałami fluorescencyjnymi
- Oprogramowanie Rotor-Gene Q w wersji 1.7.94 lub wyższej lub odpowiednie oprogramowanie do wybranego cyklera na płytce 96-dołkowej
- Probówki w paskach i wieczka, 0,1 ml, do stosowania z Rotor-Gene Q (nr kat. 981103 lub 981106) lub probówki i wieczka do PCR, 0,2 ml lub 96-dołkowa mikro płytką optyczną z optycznym filmem uszczelniającym lub

pokrywą do wybranego real-time cyklera na płytce 96-  
dołkowe

## Ważne informacje

### Ogólne środki ostrożności

Użytkownik powinien zawsze zwracać uwagę na następujące punkty:

- Używać wolnych od nukleaz końcówek do pipet z filtrami.
- Materiały pozytywne (próbki, kontrole pozytywne i amplikony) należy przechowywać i ekstrahować oddzielnie od wszystkich pozostałych odczynników oraz dodawać je do mieszaniny reakcyjnej w miejscu odpowiednio oddzielnym.
- Przed rozpoczęciem testu rozmrozić wszystkie składniki na lodzie.
- Po rozmrożeniu wymieszać składniki poprzez odwracanie i krótko odwirować.
- Nie używać składników zestawu diagnostycznego po upływie terminu ważności.
- Podczas ustawiania reakcji należy trzymać wszystkie próbki i kontrole na lodzie lub na bloku chłodzącym.

### Kontrola negatywna

Do każdego przebiegu PCR należy dołączać co najmniej jedną kontrolę negatywną. Umożliwia to ocenę zanieczyszczenia reakcji.

### Kontrola pozytywna

W przypadku wykonywania PCR nieznanymi próbkami zalecane jest dołączenie kontroli pozytywnej do przebiegu PCR, która zawiera próbkę, o której wiadomo, że zawiera RNA

docelowego wirusa. Kontrola pozytywna służy do sprawdzenia funkcjonalności oznaczenia patogenu, np. prawidłowego przygotowania mieszaniny reakcyjnej. Użyć 5 µl kontroli pozytywnej (Positive Control), dostarczonej z zestawem *virotype* BTV pan/8 RT-PCR, do sprawdzenia zakończonej powodzeniem amplifikacji docelowej sekwencji.

## **Kontrola ekstrakcji i amplifikacji**

W celu zapewnienia większego bezpieczeństwa i wygody do zestawu dołączone jest oznaczenie kontrolne ekstrakcji i amplifikacji w postaci dodatkowego zestawu primerów/sond, który wykrywa obecny w próbce gen metabolizmu podstawowego (tzw. housekeeping gene). Umożliwia to monitorowanie ekstrakcji oraz amplifikacji.



# Protokół: Real-time RT-PCR przy użyciu Rotor-Gene Q

## Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Przed rozpoczęciem należy przeczytać „Ważne uwagi” na stronie 14.
- Dołączyć co najmniej jedną kontrolę pozytywną (Positive Control) i jedną kontrolę negatywną (Negative Control) na przebieg PCR.
- Przed rozpoczęciem procedury należy dokładnie przeczytać protokół i upewnić się, że użytkownik jest zaznajomiony z obsługą wybranego cyklera do real-time PCR.
- RNA jest niestabilne. Czynności protokołu należy wykonywać bez przerw.

## Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Rozmrozić wszystkie odczynniki na lodzie i chronić przed światłem.
- Podczas ustawiania PCR należy trzymać odczynniki na lodzie.
- Przed użyciem należy krótko odwirować odczynniki.

## Procedura

- 1. Przenieść pipetą co najmniej 7 µl próbek RNA lub kontroli pozytywnej do indywidualnych 0,2 ml probówek do PCR. Przykryć probówki (np. filmem uszczelniającym do PCR).**

Dołączyć kontrole pozytywne.

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

2. **Próbki denaturować przez 5 minut w temperaturze 98°C w standardowym cyklerze na płytce 96-dołkowej, z ogrzewaną pokrywą.**
3. **Niezwłocznie schłodzić na wodzie z lodem lub w płynnym azocie przez co najmniej 20 sekund. Następnie przechowywać na lodzie lub w chłodziarce.**
4. **Przenieść pipetą 5  $\mu\text{l}$  próbek z RNA, kontroli pozytywnej i kontroli negatywnej do indywidualnych probówek w paskach i wieczek, 0,1 ml, do stosowania z Rotor-Gene Q. Użyć 5  $\mu\text{l}$  kontroli negatywnej (Negative Control) zamiast RNA z próbki.**
5. **Dodać 20  $\mu\text{l}$  mieszaniny Master Mix do każdej probówki. Objętość końcowa wynosi zatem 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>	<b>25 <math>\mu\text{l}</math></b>

6. **Zamknąć probówki odpowiednimi wieczkami.**
7. **W oprogramowaniu termocyklera ustawić filtry dla barwników reporterów zgodnie z Tabelą 2. Wybrać zielony, czerwony i żółty kanał na Rotor-Gene Q.**

**Tabela 2. Ustawienia filtra dla reportera**

<b>Patogen/kontrola wewnętrzna</b>	<b>Reporter</b>
BTV	FAM
BTV-8	Cy5
Kontrola wewnętrzna	HEX/JOE™*

\* Stosować opcję odpowiednią dla używanego termocyklera

- 8. Wykonać protokół real-time RT-PCR zgodnie z Tabelą 3 w przypadku analizowania tylko zestawu *virotype* BTV/pan8 RT-PCR.**

**Tabela 3. Protokół real-time RT-PCR dla BTV pan/8**

<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 fluorescencyjnych.

- 9. Wykonać protokół real-time RT-PCR zgodnie z Tabelą 4 w przypadku jednoczesnego analizowania innych zestawów *virotype* (tzn. *virotype* PRRSV, *virotype* BVDV, *virotype* CSFV, *virotype* SBV i/lub *virotype* Influenza A).**

**Tabela 4. Protokół real-time RT-PCR dla oznaczeń równoległych**

<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 fluorescencyjnych.

## **Protokół: Real-time RT-PCR przy użyciu cyklera real-time na płytki 96-dołkowe**

Przeczytać „Ważne uwagi”, strona 14 oraz „Ważne informacje przed rozpoczęciem” i „Czynności do wykonania przed rozpoczęciem”, strona 17.

### **Procedura**

- 1. Przenieść pipetą 5 µl próbek z RNA, kontroli pozytywnej i kontroli negatywnej do indywidualnych probówek. Przykryć probówki (np. filmem uszczelniającym do PCR).**

Dołączyć kontrole pozytywne i negatywne.

Kontrola pozytywna: Użyć 5 µl kontroli pozytywnej (Positive Control) zamiast RNA z próbki.

Kontrola negatywna: Użyć 5 µl kontroli negatywnej (Negative Control) zamiast RNA z próbki.

- 2. Próbkę denaturować przez 5 minut w temperaturze 98°C w standardowym cyklerze na płytki 96-dołkowe, z ogrzewaną pokrywą.**
- 3. Niezwłocznie schłodzić na wodzie z lodem lub w płynnym azocie przez co najmniej 20 sekund. Następnie przechowywać na lodzie lub w chłodziarce.**
- 4. Przenieść pipetą 20 µl mieszaniny Master Mix do każdej probówki. Objętość końcowa testu wynosi zatem 25 µl (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 probówki odpowiednimi wieczkami.**
- 6. W oprogramowaniu termocyklera ustawić filtry dla barwników reporterów zgodnie z Tabelą 6.**

**Tabela 6. Ustawienia filtra dla reportera**

<b>Patogen/kontrola wewnętrzna</b>	<b>Reporter</b>
BTV	<b>FAM</b>
BTV-8	<b>Cy5</b>
Kontrola wewnętrzna	<b>HEX/JOE*</b>
Pasywny barwnik referencyjny <sup>†</sup>	<b>ROX</b>

\* Stosować opcję odpowiednią dla używanego termocyklera

<sup>†</sup>Wewnętrzny barwnik referencyjny do stosowania z ABI PRISM<sup>®</sup> Sequence Detection Systems firmy Applied Biosystems<sup>®</sup>.

- 7. Wykonać protokół real-time RT-PCR zgodnie z Tabelą 7 w przypadku analizowania tylko zestawu *virotype* BTV/pan8 RT-PCR.**

**Tabela 7. Protokół real-time RT-PCR dla BTV pan/8**

Temperatura	Czas	Liczba cykli
50°C	10 min	1
95°C	10 min	1
95°C	15 s	40
60°C <sup>‡</sup>	60 s	

<sup>‡</sup> Rejestracja danych fluorescencyjnych.

- 8. Wykonać protokół real-time RT-PCR zgodnie z Tabelą 8 w przypadku jednoczesnego analizowania innych zestawów *virotype* (tzn. *virotype* PRRSV, *virotype* BVDV, *virotype* CSFV, *virotype* SBV i/lub *virotype* Influenza A).**

**Tabela 8. Protokół real-time RT-PCR dla oznaczeń równoległych**

Temperatura	Czas	Liczba cykli
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 fluorescencyjnych.

# Analiza i interpretacja danych

## Interpretacja wyników

Aby test był ważny, kontrola pozytywna musi wytwarzać sygnał w kanałach FAM, Cy5 i HEX przy  $C_T^* < 35$ . Jeśli nie są mierzone sygnały FAM ani Cy5 kontroli pozytywnej, etapy denaturacji i chłodzenia były niewystarczające i konieczne jest powtórzenie testu. Kontrola negatywna nie może wytwarzać sygnału.

W przypadku pracy z nieznanymi próbkami możliwe są następujące wyniki. Możliwe wyniki dla próbki są również podsumowane w Tabeli 9 na stronie 26.

### **Próbka jest pozytywna dla BTV i BTV-8 oraz oznaczenie jest ważne, jeśli spełnione są następujące kryteria:**

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

Należy zauważyć, że bardzo duże stężenia RNA BTV w próbce mogą prowadzić do słabszego sygnału HEX lub braku sygnału HEX z powodu konkurencji z kontrolą wewnętrzną.

\* Cykl przekroczenia wartości progowej ( $C_T$ ) — cykl, w którym wykres amplifikacji przekracza próg, tzn. występuje pierwsze wyraźne wykrywalne zwiększenie fluorescencji.

† Zielony, czerwony i żółty w urządzeniu Rotor-Gene Q.



**Próbka jest pozytywna dla BTV, negatywna dla BTV-8 oraz oznaczenie jest ważne, jeśli spełnione są następujące kryteria:**

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

Należy zauważyć, że bardzo duże stężenia RNA BTV w próbce mogą prowadzić do słabszego sygnału HEX lub braku sygnału HEX z powodu konkurencji z kontrolą wewnętrzną.

**Próbka jest negatywna dla BTV i BTV-8 oraz oznaczenie jest ważne, jeśli spełnione są następujące kryteria:**

- Próbka wytwarza sygnał tylko w kanale HEX
- Kontrola pozytywna wytwarza sygnał we wszystkich kanałach
- Kontrola negatywna nie wytwarza żadnego sygnału

Pozytywny sygnał HEX wyklucza możliwość inhibicji PCR i/lub nieprawidłowej ekstrakcji RNA, ponieważ kontrola wewnętrzna była amplifikowana z powodzeniem.

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

- Próbkę nie wytwarza sygnału w żadnym z kanałów fluorescencji

Doszło do inhibicji PCR lub ekstrakcja próbki była nieprawidłowa. Zalecane jest ponowne wykonanie testu odpowiednich, poszczególnych próbek w wodzie wolnej od nukleaz (np. rozcieńczonej w proporcji 1:5), powtórzenie ekstrakcji RNA lub powtórzenie całego testu, rozpoczynając z nowym materiałem próbki.

Sprawdzić, czy sygnał fluorescencyjny występuje we wszystkich kanałach dla kontroli pozytywnej (Positive Control). Brak sygnału dla kontroli pozytywnej wskazuje na błąd, który może wynikać z nieprawidłowej denaturacji RNA, błędu ekstrakcji RNA lub nieprawidłowych warunków przetwarzania w cyklerze.

Powtórzyć ekstrakcję RNA lub powtórzyć całą procedurę, rozpoczynając z nowym materiałem próbki.

**Tabela 9. Tabela interpretacji wyników**

Sygnał fluorescencyjny	BTV	BTV-8	Patogen	
			Negatywny	Nieważny
FAM	X	X		
Cy5		X		
HEX	(X)	(X)	X	

\* Wyniki próbki można interpretować w przypadku wykonania reakcji kontroli pozytywnej i negatywnej. Kontrola pozytywna musi wytwarzać sygnał w kanałach

FAM, Cy5 i HEX. Kontrola negatywna nie może wytwarzać sygnału. Kompletne objaśnienie możliwych wyników próbki można znaleźć w punkcie „Analiza i interpretacja danych” na stronie 24.

## **Rozwiązywanie problemów**

Naukowcy z działu pomocy technicznej firmy QIAGEN z chęcią odpowiedzą na wszystkie Państwa pytania dotyczące zarówno informacji i opisów protokołów zawartych w tej instrukcji obsługi, jak i technologii oznaczenia (informacje kontaktowe znajdują się na tylnej okładce lub na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Dane do zamówień

Nazwa produktu	Zawartość	Nr kat.
<i>virotype</i> BTV pan/8 RT-PCR Kit (24)	Na 24 reakcje: mieszanina Master Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna	280443
<i>virotype</i> BTV pan/8 RT-PCR Kit (96)	Na 96 reakcji: mieszanina Master Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna	280445
<i>virotype</i> BTV pan/8 RT-PCR Kit (480)*	Na 480 reakcji: mieszanina Master Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna	280447
<b>Powiązane produkty</b>		
<i>bactotype</i> MAP PCR Kit (24) <sup>†</sup>	Na 24 reakcje: mieszanina Master Mix, kontrola wewnętrzna DNA, kontrola pozytywna, kontrola negatywna	285903
<i>virotype</i> ASFV PCR Kit (96)	Na 96 reakcji: mieszanina Master Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna	281905
<i>virotype</i> BTV RT- PCR Kit (96) <sup>†</sup>	Na 96 reakcji: mieszanina PCR Mix, mieszanina enzymów Enzyme Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna	280435
<i>virotype</i> PRRSV RT- PCR Kit (96) <sup>†</sup>	Na 96 reakcji: mieszanina Master Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna	282305

\*Dostępne tylko na zamówienie.

<sup>†</sup> Dostępne są inne wielkości zestawu, patrz [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

<b>Nazwa produktu</b>	<b>Zawartość</b>	<b>Nr kat.</b>
<i>virotype</i> BVDV RT-PCR Kit (96)*	Na 96 reakcji: mieszanina PCR Mix, mieszanina enzymów Enzyme Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna	280375
<i>virotype</i> CSFV RT-PCR Kit (96)*	Na 96 reakcji: mieszanina Master Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna	281805
<i>virotype</i> SBV RT-PCR Kit (96)*	Na 96 reakcji: mieszanina Master Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna	281605
<i>virotype</i> Influenza A RT-PCR Kit (96)*	Na 96 reakcji: mieszanina Master Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna	282605
<i>bactotype</i> Mycoplasma Mg/Ms PCR Kit (96)*	Na 96 reakcji: mieszanina Master Mix, kontrola pozytywna, kontrola negatywna	288105
QIAamp <i>cador</i> Pathogen Mini Kit (50)*	Na 50 przygotowań: 50 kolumn wirowych QIAamp Mini, nośnikowe RNA, proteinaza K, próbki do pobierania (2 ml), bufony wolne od RNazy	54104
QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)*	Na 50 przygotowań RNA: 50 kolumn wirowych QIAamp Mini, nośnikowe RNA, próbki do pobierania (2 ml), bufony wolne od RNazy	52904

\* Dostępne są inne wielkości zestawu, patrz [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Nazwa produktu	Zawartość	Nr kat.
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (50)	Na 50 przygotowań: 50 kolumn wirowych RNeasy Mini, probówki do pobierania (1,5 ml i 2 ml), proteinaza K, wolna od RNazy DNaza I, wolne od RNazy odczynniki i bufor	74704
RNeasy Mini Kit (50)*	Na 50 przygotowań: 50 kolumn wirowych RNeasy Mini, probówki do pobierania (1,5 ml i 2 ml), wolne od RNazy odczynniki i bufor	74104
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Cykler real-time PCR z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy), komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria, 1-letnia gwarancja na części i robociznę	9001570

\* Dostępne są inne wielkości zestawu, patrz [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Firma QIAGEN oferuje wybór zestawów ELISA oraz zestawów real-time PCR i real-time RT-PCR do wykrywania patogenów zwierzęcych. Na stronie [www.qiagen.com/Animal-and-Veterinary-Testing](http://www.qiagen.com/Animal-and-Veterinary-Testing) można znaleźć więcej informacji o produktach *bactotype*<sup>®</sup>, *cador*<sup>®</sup>, *cattletype*<sup>®</sup>, *flocktype*<sup>®</sup>, *pigtype*<sup>®</sup> oraz *virotype*.

Aktualne informacje na temat licencji i zastrzeżeń dotyczących konkretnych produktów można uzyskać z podręcznika odpowiedniego zestawu QIAGEN lub z instrukcji obsługi. Instrukcje obsługi zestawów QIAGEN są dostępne na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Można je także zamówić w dziale pomocy technicznej firmy QIAGEN lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.



Znaki towarowe: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube®, *bactotype*®, *cador*®, *cattletype*®, *flocktype*®, *pigtype*®, RNeasy®, Rotor-Gene®, *virotype*® (QIAGEN Group); Applied Biosystems®, ABI PRISM®, FAM™, HEX™, JOE™, ROX™, TAMRA™ (Applera Corporation lub przedsiębiorstwa zależne); Eppendorf® (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH); Cy™ (GE Healthcare). Zarejestrowane nazwy, znaki towarowe itp. wykorzystane w niniejszym dokumencie, nawet jeśli nie są specjalnie oznakowane, nie mogą być uznawane jako prawnie niechronione.

Nabywanie tego produktu umożliwi zastosowanie go przez nabywcę do amplifikacji i detekcji sekwencji kwasów nukleinowych do diagnostyki *in vitro* w zwierząt. Niniejszym nie udziela się praw patentowych ani innych licencji żadnego typu poza powyższym prawem użytkownika wynikającym z nabycia produktu.

Ograniczona umowa licencyjna dla zestawu *virotype* BTV pan/8 RT-PCR

Użytkowanie tego produktu oznacza wyrażenie zgody nabywcy lub użytkownika tego produktu na następujące warunki:

1. Produkt można używać wyłącznie zgodnie z protokołami dostarczonymi z produktem i niniejszą instrukcją obsługi i tylko razem z elementami zawartymi w zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji na swoją własność intelektualną w zakresie używania lub włączania dołączonych elementów tego zestawu do innych składników, które nie zostały dołączone do tego zestawu, za wyjątkiem przypadków opisanych w protokołach dostarczonych z produktem, niniejszej instrukcji obsługi oraz dodatkowych protokołach dostępnych na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Niektóre z tych dodatkowych protokołów były dostarczone przez użytkowników QIAGEN dla użytkowników QIAGEN. Takie protokoły nie były dokładnie testowane ani optymalizowane przez firmę QIAGEN. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że nie naruszają one praw osób trzecich.
2. Za wyjątkiem wyraźnie określonych licencji, firma QIAGEN nie udziela gwarancji, że ten zestaw i/lub jego stosowanie nie narusza praw stron trzecich.
3. Ten zestaw i jego składniki posiadają licencję wyłącznie na jednorazowe użycie i nie wolno ich używać ponownie, regenerować ani sprzedawać ponownie.
4. Firma QIAGEN w szczególności odrzuca wszystkie inne licencje, wyrażone lub domniemane, za wyjątkiem licencji wyraźnie podanych w dokumentacji.
5. Nabywca i użytkownik tego zestawu wyrażają zgodę na niepodejmowanie ani niepozwalanie stronom trzecim na podejmowanie kroków, które mogłyby prowadzić do czynności zabronionych powyżej lub ułatwiać takie czynności. Firma QIAGEN może egzekwować zakazy niniejszej Ograniczonej umowy licencyjnej w sądzie i będzie dochodzić odzyskania wszystkich kosztów sądowych i procesowych, włącznie z kosztami prawników, przy wszystkich działaniach, które będą miały na celu egzekucję postanowień niniejszej Ograniczonej umowy licencyjnej lub praw do własności intelektualnej związanych z tym zestawem i/lub jego składnikami.

Aktualne warunki licencji są dostępne na stronie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2013–2014 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

---

**www.qiagen.com**

**Australia** ■ techservice-au@qiagen.com

**Austria** ■ techservice-at@qiagen.com

**Belgium** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Brazil** ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

**China** ■ techservice-cn@qiagen.com

**Denmark** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Finland** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**France** ■ techservice-fr@qiagen.com

**Germany** ■ techservice-de@qiagen.com

**Hong Kong** ■ techservice-hk@qiagen.com

**India** ■ techservice-india@qiagen.com

**Ireland** ■ techservice-uk@qiagen.com

**Italy** ■ techservice-it@qiagen.com

**Japan** ■ techservice-jp@qiagen.com

**Korea (South)** ■ techservice-kr@qiagen.com

**Luxembourg** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Mexico** ■ techservice-mx@qiagen.com

**The Netherlands** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Norway** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Singapore** ■ techservice-sg@qiagen.com

**Sweden** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Switzerland** ■ techservice-ch@qiagen.com

**UK** ■ techservice-uk@qiagen.com

