

ID Gene™ Bluetongue Duplex

Ref: IDBTv-50 / IDBTv-100

50 / 100 testes



PCR Real Time para a detecção qualitativa do Vírus da Língua Azul (BTV)

Amostra adequada: sangue total de ruminantes (individual ou pool de até 10 amostras), órgão que pode ser utilizado (baço)

Para uso in vitro



Produto veterinário isento de registro conforme Decr. 5053/2004 alterado pelo Decr. 8448/2015, art. 44, inciso XVI

Responsável Técnica: Dra. Patrícia Stocco Betiol - CRMV-SP nº 14795

Prazo de validade: vide bula

Proprietário e Fabricante: ID-VET, Grabels, França

Representante no Brasil e importador exclusivo: ID-VET América Latina Ltda.

Rua Candelária, 49 – Sala 08; Indaiatuba – SP

C.N.P.J. 20.289.238/0001-96

Produto importado

IDvet Genetics, 310, rue Louis Pasteur – Grabels - FRANCE

Tel: + 33 (0)4 67 41 49 33 - Fax: + 33 (0)4 67 45 36 95

www.id-vet.com - E-mail: info@id-vet.com

Informações gerais

• Características

O kit ID Gene™ Bluetongue Duplex (IDBTV) é um PCR Tempo Real que amplifica uma sequência alvo do genoma viral do Vírus da Língua Azul (BTV).

Este kit é um teste duplex qualitativo. Ele amplifica simultaneamente o RNA alvo e o controle endógeno interno.

O kit contém um controle positivo alvo (TPC-BTV) que é extraído da mesma forma que as amostras para validar a extração e a amplificação da sequência alvo.

Este kit pode ser utilizado para testar sangue total de ruminantes coletado com o anticoagulante EDTA, em amostras individuais ou pools de até 10 amostras, ou utilização de amostra de órgão, no caso o baço.

• Componentes do kit e condições de armazenamento

O kit IDBTV contém os reagentes demonstrados abaixo:

Referência	Componente	Volume	Descrição
TPC-BTV	Controle positivo alvo	550 µL 1 frasco	BTV inativado, diluído em uma matriz de sangue negativa para o vírus, liofilizado e calibrado entre 10 a 100 vezes do limite de detecção do método. O grânulo liofilizado deve ser reconstituído em 550 µL de água destilada ou em água livre de Nucleasse.
ARM-BTV	Mix de Amplificação de Reação	400 µL 1 / 2 tubos (tampa branca)	Mix de reação, pronto para uso, contendo: transcriptase reversa, Taq polimerase e oligonucleotídeos para a detecção do BTV e do controle positivo endógeno não alvo.

Todos os componentes devem ser estocados a $\leq -16^{\circ}\text{C}$. É recomendado preparar alíquotas (mínimo de 100 µL) e não descongelar os componentes mais de 3 vezes.

• Equipamento necessário não fornecido no kit

Todo o material a ser utilizado deve ter qualidade adequada para utilização em biologia molecular.

Instrumento de amplificação:

- Termociclador Tempo Real capaz de ler os seguintes comprimentos de onda: 525nm (FAM), 548nm (Yakima Amarelo, equivalente a VIC) e 650nm (Cy5).

Exemplos de termocicladores compatíveis: CFX96™, Chromo4™ (Biorad), LC®480 I, LC®480 II, LC®96 Roche, AB® 7500 e Rotor-Gene Q da Qiagen

Por favor, entre em contato com a IDvet para a utilização de outros termocicladores.

- Aquecedor e agitador (ex: Thermomixer) capaz de aquecer a 95°C.

Consumíveis:

- Pipetas de precisão com capacidade para volumes entre 1 µL a 1000 µL com filtros de ponteiros livres de Nuclease.

- Tubos de 1,5 mL.

- Placas para PCR com 96 poços, tiras ou microtubos de PCR (que tenham qualidade óptica compatível com o termociclador) e apropriada película adesiva adaptada ou tampas.

- Rack refrigerado.

Reagentes:

- É recomendada a utilização de água destilada ou livre de Nuclease.

Observações e precauções

Os componentes do kit têm menos de 0,1% de substâncias perigosas ou carcinogênicas, portanto, fichas de segurança não são necessárias. No entanto, é recomendado tomar precauções adequadas como com qualquer produto bioquímico, e utilizar vestimenta adequada (como luvas e aventais por exemplo).

Controles de extração

• Controles positivos

O kit IDBTV contém os seguintes controles positivos:

- **Controle positivo alvo (TPC-BTV):**

Esse controle consiste do vírus BTV inativado, diluído em uma matriz de sangue negativa para o vírus, liofilizado e calibrado entre 10 a 100 vezes do limite de detecção do método.

Esse controle valida a extração e a amplificação da sequência alvo.

Esse controle é preparado e extraído da mesma forma que as amostras a serem testadas.

- Controle positivo endógeno não alvo (NTPCen):

Este controle está constitutivamente presente nas células das amostras a serem testadas. Ele valida a lise celular (1) e a amplificação do gene não alvo (2). Ele também confirma a presença de células e dá uma indicação do estado das amostras.

• Controles negativos

É recomendado incluir os seguintes controles negativos em cada corrida:

- Controle negativo de extração (NEC)

Este controle deve ser preparado e extraído da mesma forma que as amostras a serem testadas, mas não pode conter nenhum RNA alvo. O volume ocupado pela amostra é substituído por uma matriz não reativa ou por água livre de nucleases.

- Controle negativo para amplificação (NAC)

Este controle contém 8µL de mix de reação (ARM-BTV) e 5 µL de água livre de nucleases. Ele é incluído em cada ciclo de análise para o controle da presença de algum possível contaminante aerossol.

• Extração do RNA viral

O RNA viral deve ser extraído da amostra a ser testada antes de ser amplificado no PCR Tempo Real.

Para isso, a IDvet Genetics oferece uma gama de kits de extração de acordo com o padrão Francês NF U47-600.

Descrição	Nome do produto	Código do produto
Sistema de extração de grânulos Magnético	ID Gene™ Mag Universal Extraction Kit	MAG192/MAG384
	ID Gene™ Mag Fast Extraction Kit	MAGFAST384
Sistema de extração de coluna	ID Gene™ Spin Universal Extraction Kit	SPIN50/SPIN250

• Extração dos controles

Os volumes do controle a ser extraído estão descritos na tabela abaixo:

Importante:

- Os volumes indicados são válidos independente do sistema de extração.
- Os controles devem ser extraídos ao mesmo tempo que as amostras a serem testadas.

Controle	Volume
TPC-BTV	50µL

Nota: Se o NEC for preparado com matriz de amostra negativa, consultar o protocolo do kit de extração para a matriz em questão.

Protocolo de amplificação

• Preparação da reação de amplificação do PCR em Real Time (RT-PCR)

1. Preparar um plano experimental para as análises das amostras e dos controles, assegurando-se que haja uma distância entre o controle positivo (TPC-BTV) e as outras amostras.
2. Descongelar o kit IDBTV preferencialmente a +5°C (± 3°C) em rack refrigerado. Descongelar em temperatura ambiente (+21°C ± 5°C) apenas se a mistura for utilizada imediatamente após o descongelamento.
3. Homogeneizar os componentes do tubo ARM-BTV por sistema vórtex. Centrifugar em baixa rotação por curto período.
4. Adicionar 8 µL de ARM-BTV em cada microcavidade ("well"). Usar tiras ("strips") para PCR ou microplacas adaptadas ao termociclador que está sendo utilizado.
5. Aquecer extemporaneamente o RNA extraído das amostras e dos controles durante 3 minutos (+1 min) a 95°C(±2°C), para desnaturar a fita dupla de RNA do BTV.
6. Imediatamente após o aquecimento, colocar os extratos desnaturados em gelo ou em temperatura a +5°C (±3°C).
7. Adicionar à mistura reacional:
 - 5 µL de RNA extraído de cada amostra a ser analisada
 - 5 µL de RNA extraído do TPC-BTV
 - 5 µL do NEC extraído
 - 5 µL de água livre de Nuclease (NAC)

Nota: É recomendado utilizar rack refrigerado, durante a distribuição das amostras, para manter a desnaturação da fita dupla de RNA.

8. Cobrir a placa ou as tiras com apropriada película adesiva ou capas.

• Programação da fase de amplificação

1. Programar os detectores do termociclador para ler os seguintes comprimentos de onda para cada microcavidade:

Alvo	Fluoróforo	λ (nm)	Quencher
BTV	FAM	495-525	não fluorescente
NTPCen	VIC/Yakima Amarelo	426-548	não fluorescente (compatível com VIC/HEX)

Nota: Para equipamentos que requerem uma referência interna de calibração óptica, o mix de amplificação ARM-BTV contém ROX.

2. Escolher entre os dois diferentes programas de amplificação validados pela IDvet Genetics:

- Programa padrão (permite que kits PCR de diferentes fornecedores sejam usados em uma única sessão) ou
- Programa rápido

Passo	Programa padrão	Programa rápido	Número de ciclos
(1) Transcrição reversa	10 min a 45°C	10 min a 45°C	1
(2) Ativação da polimerase	10 min a 95°C	2 min a 95°C	1
(3) Desnaturação/alongamento do DNA	15 seg a 95°C	10 seg a 95°C	40
	60 seg a 60°C	30 seg a 60°C	

Nota: A leitura fluorescente é realizada no final da fase de alongamento a 60°C.

3. Selecione um ou mais destes programas no termociclador e selecione um volume final de **13µL por PCR**. Se diferentes volumes forem combinados em uma única corrida, digite o maior volume na placa.
4. Coloque a placa de PCR, as tiras de PCR ou os capilares no termociclador e inicie o programa.

Validação e interpretação dos resultados

• Validação do ensaio

A análise dos resultados baseia-se no valor de ciclo de quantificação (Cq) de cada amostra que é obtido por cada detector. O Cq também é conhecido como valor de Ct (limiar do ciclo).

O teste é validado de acordo com os critérios descritos na tabela abaixo. **O resultado não pode ser interpretado de forma confiável se algum dos critérios não for cumprido.**

Controle	Resultado esperado	Critério de aceitação
TPC-BTV	Detectado em FAM e VIC	Presença de curva característica Consultar o valor de Cq fornecido no certificado de controle de qualidade
NTPCen	Detectado em VIC em cada amostra	Presença de uma curva característica
NEC	Nada será detectado se for usado água Detectado em VIC se for usada amostra negativa para o vírus	Completa ausência de curva característica Presença de curva característica
NAC	Ausência de detecção	Ausência completa de curva característica

Nota: O TPC-BTV pode ser usado para monitorar variações de sensibilidade analítica, porque é calibrado entre 10 a 100 vezes do limite de detecção do método.

• Sugestão de interpretação dos resultados

Para cada amostra, os resultados podem ser interpretados de acordo com o critério a seguir:

Amostra	Sinal de BTV	Sinal de NTPCen	Interpretação
Individual	Detectado	Detectado ou não detectado	Animal detectado como positivo para BTV
	Não detectado	Detectado	Animal não detectado para BTV
	Não detectado	Não detectado	Ocorrência de problema durante a distribuição da amostra ou no processo de extração/a reação de PCR foi inibida
Pool de amostras	Detectado	Detectado ou não detectado	Ao menos 1 animal detectado como positivo para BTV É requerida a análise individual das amostras que foram testadas juntas
	Não detectado	Detectado	Mistura de amostras negativas
	Não detectado	Não detectado	Ocorreu um problema durante a distribuição ou processo de extração das amostras/ a reação de PCR foi inibida

Amostras não validadas:

- Se o NTPCen não for detectado, mas a amostra for detectada como positiva para BTV, considerar a amostra como sendo positiva.

- Se o TPCen não for detectado:

- Um problema ocorreu durante a distribuição das amostras ou durante o processo de extração. Neste caso, a amostra deve ser extraída novamente.

- Ou a reação de PCR foi inibida. Neste caso, fazer uma nova amplificação seguindo o procedimento abaixo.

Procedimento a seguir se a reação de PCR foi inibida:

1. Diluir o RNA extraído 10 vezes em água livre de Nuclease.
2. Repetir a fase de amplificação em 5µL dessa diluição.
3. Se o NTPCen for detectado, interpretar a amostra de acordo com a tabela acima.
4. Se o NTPCen não for detectado, extrair novamente a amostra ou considera-la como ininterpretável.

Documentação e suporte técnico

Para perguntas e suporte técnico, por favor, contatar: info@id-vet.com

Para informações adicionais, visite www.id-vet.com