Souprava VetMAX™ PRRSV EU & NA 2.0

Detekce viru zodpovědného za reprodukční a respirační syndrom prasat pomocí RT-PCR v reálném čase

**Katalogové číslo** A35751

**Publikace č.** MAN0016810 **Rev**. D.0

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Technologie** | **Druhy** | **Matrice vzorku** | **Typ testu** |
| Real-time RT-PCR (RNA)   * Triplexová analýza * Exogenní IPC | Prase | * Sérum * Plná krev * Sperma * Tkáň * Orální tekutina * Supernatant z buněčné kultury | Individuální nebo sdružený[1] |

[1] Sloučený materiál zahrnující až pět vzorků séra, plné krve nebo spermatu.

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\uzivatel\AppData\Local\Temp\FineReader11.00\media\image1.png | **VAROVÁNÍ!** Přečtěte si bezpečnostní listy (SDS) a dodržujte pokyny k manipulaci. Používejte vhodné ochranné brýle, oděv a rukavice. Bezpečnostní listy (BL) jsou k dispozici na adrese **thermofisher.com/support.** |

**Popis výrobku**

Souprava Applied Biosystems ™ VetMAX ™ PRRSV EU & NA 2.0 umožňuje detekci viru reprodukčního a respiračního syndromu prasat (PRRSV) pomocí RT-PCR v reálném čase. Souprava má aktualizované provedení a je schopna detekovat cirkulující kmeny PRRSV. Souprava obsahuje testy a reagencie pro detekci cílových struktur PRRSV EU, PRRSV NA a interních pozitivních kontrol (IPC) pomocí jednojamkové RT-PCR v reálném čase za použití chemických reagencií pro hydrolýzu fluorescenční sondy.

Souprava je validována pro použití na RNA extrahované ze séra, plné krve, spermatu, tkání, orální tekutiny a supernatantu z buněčné kultury. Validační zpráva je k dispozici na vyžádání u vašeho obchodního zástupce nebo technického specialisty.

PRRSV způsobuje významné ztráty v chovech prasat v důsledku reprodukčních poruch, respiračních stavů a zpomalení růstu. PRRSV RNA může být detekována v krvi a spermatu 24-48 hodin po infekci. RT-PCR v reálném čase je nejcitlivější metodou pro detekci viru PRRSV a je výborným nástrojem pro management zdraví stáda.

Souprava obsahuje následující testy a reagencie.

* **3 - Mix PRRS EU/NA 2.0**: Obsahuje primery, sondy, pufry a enzymy pro optimalizovanou detekci cílových struktur PRRSV EU, PRRSV NA a IPC pomocí triplexové RT-PCR v reálném čase.
* **4a - EPC PRRS EU/NA 2.0**: RNA templát s cílovými sekvencemi PRRSV EU a PRRSV NA. Slouží jako externí pozitivní kontrola pro složky RT-PCR v reálném čase a používá se k nastavení validačních kritérií pro výsledky testů.
* **5 - IPC PRRS**: Přidává se do každého testovacího a kontrolního vzorku v lyzačním kroku postupu izolace RNA. Slouží jako exogenní interní pozitivní kontrola pro postup izolace RNA a používá se k monitorování přítomnosti inhibitorů PCR.

**Obsah a skladování**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Složka** | **Množství[1]** | **Skladování** |
| 3 - Mix PRRS EU/NA 2.0 | 2 x 600 μl | -30°C až -10°C |
| 4a - EPC PRRS EU/NA 2.0 | 2 x 150 μl |
| 5 - IPC PRRS | 2 x 200 μl |

[1] Objemy jsou dostačující pro 100 reakcí RT-PCR v reálném čase (12 μl).

**Potřebné materiály nejsou součástí dodávky**

MLS: od společnosti Fisher Scientific (**fisherscientific.com**) nebo od jiného významného dodavatele pro laboratoře.

|  |  |
| --- | --- |
| **Položka** | **Zdroj** |
| **Přístroj pro PCR v reálném čase, jeden z následujících:** | |
| Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System   * Precision Plate Holder for 7500 Real-Time PCR Systems (A24820) * Precision Plate Holder for 0.2 mL Tubes and Strips (4367033) | Kontaktujte místní obchodní kancelář. |
| Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System   * Precision Plate Holder for 7500 Fast Real-Time PCR Systems (4359652) * 7500 Fast Precision Plate Holder, for 0.1 mL Tube Strips (A29252) |
| Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System |

|  |  |
| --- | --- |
| **Položka** | **Zdroj** |
| **Zařízení** | |
| Nastavitelné pipetory | MLS |
| Mikrocentrifuga | MLS |
| Centrifuga s destičkovým adaptérem | MLS |
| Laboratorní míchačka (třepačka vortex nebo ekvivalentní) | MLS |
| Dvě nádoby na led nebo chlazené stojany:   * Jedna pro oblast nastavení PCR, kde je připraven hlavní mix pro PCR * Jedna pro oblast, kde jsou připraveny vzorky RNA a kontroly | MLS |
| **Zkumavky, destičky a další spotřební materiál** | |
| Optické reakční desky a adhezivní kryty | thermofisher.com/plastics |
| Pipetovací špičky | thermofisher.com/[pipettetips](http://www.thermofisher.com/pipettetips) |
| Jednorázové rukavice | MLS |
| **Reagencie** | |
| Voda bez nukleáz (nikoli ošetřena DEPC) | AM9939 |
| 1X TE pufr | MLS |

**Postup**

* Použijte následující kontrolní reakce pro každý cyklus RT-PCR v reálném čase.
  + Positive control (Pozitivní kontrola) - použijte 4a - EPC PRRS EU / NA 2.0.
  + Extraction control (Extrakční kontrola) - použijte vzorově purifikované vzorky, které byly připraveny stejným postupem izolace RNA jako testované vzorky.
  + No-template control (Kontrola bez templátu) (NTC) - použijte vodu bez nukleáz.
* Dodržujte správnou laboratorní praxi, aby se zabránilo falešně pozitivním výsledkům a kontaminaci testovaných vzorků PCR produkty (viz ["Správná laboratorní praxe pro PCR a RT-PCR"](#bookmark15) [strana](#bookmark15) 4).

**Pokyny pro vstupní RNA**

|  |  |
| --- | --- |
| **Krok, proces nebo parametr** | **Doporučení** |
| Metoda izolace RNA | Applied Biosystems™ MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (Cat. No. A32700) |
| Změna metody izolace RNA pro testované vzorky a vzorově purifikované vzorky | Přidejte 4 μl 5-IPC PRRS do lyzačního roztoku použitého pro izolaci RNA. |
| Příprava vzorově purifikovaných vzorků pro použití v extrakčních kontrolách pro PCR | Připravte minimálně jeden vzorově purifikovaný vzorek, jako výchozí materiál použijte vodu bez nukleázy (neošetřenou DEPC).  Zpracujte vzorově purifikovaný vzorek souběžně ve stejném postupu izolace RNA, který se používá pro testované vzorky. |

**Příprava**

1. Rozmrazte reagencie a vzorky:
2. Rozmrazte 3 - Mix PRRS EU/NA 2.0 v nádobě s ledem nebo v chlazeném stojanu.
3. Rozmrazte 4a - EPC PRRS EU/NA 2.0, 5 - IPC PRRS a vzorky RNA v oddělené nádobě s ledem nebo v odděleném chlazeném stojanu.
4. Důkladně promíchejte obsah každé zkumavky pomocí třepačky a poté krátce centrifugujte, aby se obsah dostal na dno zkumavky.

Rozmrazené reagencie a vzorky skladujte při teplotě 2-8 °C až do použití.

**Nastavte PCR reakce**

1. Rozplňte 12 μl 3-Mix PRRS EU/NA 2.0 do požadovaného počtu jamek na destičce nebo zkumavek.
2. Přidejte indikovanou složku pro každý typ reakce.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Typ reakce** | **Složka** | **Objem na reakci** |
| Zkušební vzorek | Vzorková RNA | 8,0 μl |
| Positive control (Pozitivní kontrola) | 4a - EPC PRRS EU/NA 2.0 | 8,0 μl |
| Extraction control (extrakční kontrola) | Vzorově purifikovaný vzorek | 8,0 μl |
| No-template control (Kontrola bez templátu) (NTC) | Voda bez nukleáz | 8,0 μl |

1. Každou destičku nebo zkumavku uzavřete a poté, krátce centrifugujte, aby se obsah dostal na dno jamek nebo zkumavek.

**Nastavte a spusťte přístroj pro PCR v reálném čase**

1. Nastavte běh RT-PCR v reálném čase podle pokynů výrobce za použití následujících parametrů.

* Reakční objem: 20 μl
* Pasivní reference: barvivo ROX™ (součástí reagencie 3 - Mix PRRS EU/NA 2.0)

**Poznámka:** Barvivo ROX™ musí být vybráno, pokud je přístroj schopen toto barvivo detekovat. Přístroj pro PCR v reálném čase, který není schopen detekovat barvivo ROX™, lze použít také, a to bez dopadu na přesnost čtení.

* Program přístroj pro PCR v reálném čase:
  + Standardní režim (7500 Real-Time PCR System, QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Fáze** | **Opakování** | **Teplota** | **Čas** |
| 1 | 1 | 50 °C | 5 minut |
| 2 | 1 | 95 °C | 10 minut |
| 3 | 40 | 95 °C | 15 sekund |
|  |  | 60 °C | 1 minuta |

* + Rychlý režim (7500 Fast Real-Time PCR System, QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Fáze** | **Opakování** | **Teplota** | **Čas** |
| 1 | 1 | 50 °C | 5 minut |
| 2 | 1 | 95 °C | 10 minut |
| 3 | 40 | 95 °C | 3 sekundy |
|  |  | 60 °C | 30 sekund |

1. Vyberte nebo vytvořte detektory barviv, poté přiřaďte ke každé jamce nebo zkumavce.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Cílová struktura** | **Reportér** | **Quencher** |
| PRRSV EU | Barvivo VIC™ | Nefluorescenční zhášeč |
| PRRSV NA | Barvivo FAM™ |
| IPC[1] | Cy5™ barvivo |

[1] IPC: 5 - IPC PRRS.

1. Spusťte příslušný program PCR přístroje a odeberte data amplifikace v reálném čase během inkubace při 60 ° C.

**Pokyny pro analýzu dat**

* Při analýze surových dat postupujte podle uživatelské příručky přístroje.
* Analyzujte každý fluorescenční kanál barviva nezávisle.
* Manuálně nastavte základní a prahové nastavení pro analýzu dat.

1. Pro každé barvivo reportéru nakonfigurujte nastavení analýzy pro ruční nastavení Ct.
2. Uložte nastavení analýzy a poté exportujte výsledky.

* Ujistěte se, že vzorky vykazující amplifikaci v normalizačních datech také vykazují amplifikaci v surových fluorescenčních datech.
* Pro validací cyklu a interpretací výsledků si přečtěte certifikát analýzy pro výrobní šarži soupravy.

**Validační kritéria**

Viz hodnoty CtQC v certifikátu analýzy pro výrobní šarži soupravy. Test je validován, pokud jsou splněna následující kritéria:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Typ reakce** | **Cílová struktura PRRSV EU**  **(Barvivo VIC™)** | **Cílová struktura PRRSV NA**  **(Barvivo FAM™)** | **Cíl IPC**  **(barvivo Cy5™)** | **Interpretace** |
| Positive control (Pozitivní kontrola) | Ct = CtQC EU of 4a - EPC  PRRS EU/NA 2.0 ± 3 Ct[1] | Ct = CtQC NA 4a - EPC  PRRS EU/NA 2.0 ± 3 Ct[1] | Libovolná hodnota[2] | PCR je validována. |
| Extraction control (extrakční kontrola) | Ct > 40 | Ct > 40 | Ct = CtQC 5 - IPC PRRS ± 3 Ct[3] | Izolace RNA je validována. |
| No-template control (Kontrola bez templátu) | Ct > 40 | Ct > 40 | Ct > 40 | PCR reagencie jsou validovány. |

[1] Viz tabulka EPC v certifikátu analýzy.

[2] Hodnota IPC Ct pozitivní kontrolní reakce není použita pro validaci.

[3] Viz tabulka IPC v certifikátu analýzy.

**Interpretace výsledků**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Cílová struktura PRRSV EU**  **(Barvivo VIC™)** | **Cílová struktura PRRSV NA**  **(Barvivo FAM™)** | **Cíl IPC**  **(barvivo Cy5™)** | **Interpretace** |
| Ct < 40 | Ct > 40 | Libovolná hodnota | Je detekován PRRSV EU. |
| Ct > 40 | Ct < 40 | Libovolná hodnota | Je detekován PRRSV NA. |
| Ct < 40 | Ct < 40 | Libovolná hodnota | Jsou detekovány PRRSV EU a NA. |
| Ct > 40 | Ct > 40 | Ct < Ct extrakční kontroly + 3 Ct [1] | PRRSV EU a NA nejsou detekovány. |
| Ct > 40 | Ct > 40 | Ct > Ct extrakční kontroly + 3 Ct[1] | Neplatný výsledek. |

[1] Ct extrakční kontroly musí být validována, jak je popsáno v odstavci [„Validační kritéria“ na straně 3](#bookmark10).

**U vzorků s neplatnými výsledky proveďte test znovu**

* 1. Nařeďte vzorky RNA 1:10 v 1X TE pufru.
  2. Opakujte postup RT-PCR v reálném čase s použitím 8 μl zředěné RNA a poté výsledky interpretujte následovně.

|  |  |
| --- | --- |
| **Výsledek** | **Interpretace** |
| Zředěná RNA je pozitivní alespoň na jednu cílovou strukturu PRRSV (NA nebo EU). | Výsledek je validován. |
| Zředěná RNA je negativní pro obě cílové struktury PRRSV (NA a EU) a výsledek IPC je shodný. |
| Zředěná RNA je negativní pro obě cílové struktury PRRSV (NA a EU), ale výsledek IPC je neshodný. | Výsledek je neplatný. |

* 1. Pro zředěné vzorky s neplatnými výsledky opakujte postup izolace RNA na novém alikvotu původního lyzátu vzorku.

**Správná laboratorní praxe pro PCR a RT-PCR**

* Používejte čisté rukavice a čistý laboratorní plášť.
  + Nenoste stejné rukavice a laboratorní plášť, které jste použili při manipulaci s amplifikovanými produkty nebo při přípravě vzorků.
* Vyměňte si rukavice, pokud máte podezření, že jsou kontaminované.
* Udržujte oddělené prostory a vyhrazené zařízení a zásoby pro:
  + Přípravu vzorků a nastavení reakce.
  + Amplifikaci a analýzu produktů.
* Nevnášejte amplifikované produkty do oblasti nastavení reakce.
* Všechny zkumavky se vzorkem otevírejte a uzavírejte s opatrností. Dbejte na to, aby nedošlo k rozlití nebo rozstříknutí vzorků.
* Udržujte reakce a složky uzavřené v maximální možné míře.
* Používejte pipetory typu „positive-displacement“ nebo pipetovací špičky odolné vůči aerosolům.
* Pravidelně čistěte laboratorní stoly a zařízení 10 % roztokem chlorové dezinfekce nebo dekontaminačním roztokem DNA.

**Zákaznická a technická podpora**

Navštivte **thermofisher.com/support** pro informace o nejnovějších službách a podpoře:

* Mezinárodní kontaktní telefonní čísla
* Informace o podpoře produktu
  + Časté dotazy a odpovědi k výrobkům
  + Software, opravy a aktualizace
  + Školení pro celou řadu aplikací a přístrojů
* Objednávková a webová podpora
* Dokumentace výrobku
  + Uživatelské příručky, manuály a protokoly
  + Osvědčení o analýze
  + Bezpečnostní listy (BL; známé také jako MSDS)

**Poznámka:** Pokud chcete získat bezpečnostní listy pro chemické látky jiných výrobců, kontaktujte výrobce.