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 - EPCPRRS EU/NA 2.0 ± 3 Ct[1] | Ct = CtQC NA 4a - EPCPRRS 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.