|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **applied**biosystems | NÁVOD K POUŽITÍ |  |

Avian Influenza Virus RNA Test Kit

VetMAX-Gold AIV Detection Kit

Katalogové číslo 4485261

Publikace Č. 4486415 Rev. B

|  |  |
| --- | --- |
|  | **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**](http://thermofisher.com/support)**.** |
|  |  |
|  | **VAROVÁNÍ!** Pufr 2X Multiplex RT-PCR Buffer může způsobit podráždění očí, kůže a dýchacích cest. Zamezte vdechování par. Při použití zajistěte dostatečné větrání. Zamezte kontaktu s očima a kůží. Používejte vhodné ochranné brýle, oděv a rukavice. První pomoc: Při nadýchání přeneste na čerstvý vzduch. V případě kontaktu důkladně opláchněte vodou. Pokud se objeví příznaky, vyhledejte lékařskou pomoc. |
|  |  |
|  | **VAROVÁNÍ!** Multiplex RT-PCR Enzyme Mix obsahuje ethylendioxid, který je ve státě Kalifornie považován za karcinogenní. |

**Informace o výrobku**

Název, zamýšlené použití a princip postupu

Avian Influenza Virus RNA Test Kit od firmy Applied Biosystems je vysoce citlivý, kvalitativní, jednokrokový reverzně transkripční PCR test v reálném čase (real-time RT-PCR) k detekci RNA viru aviární influenzy (AIV) izolovaného z drůbeže (vzorky orofaryngeálního / tracheálního výtěru).

AIV je obalený RNA virus s negativní polaritou, klasifikovaný do rodu Influenzavirus A, čeledi Orthomyxoviridae. Subtypy AIV jsou definovány podle povrchových glykoproteinů hemaglutininu a neuraminidázy. Kmeny viru nízce patogenní aviární influenzy (LPAI) přežívají v ptačích rezervoárových hostitelích a mohou být přeneseny na drůbež. Subtypy viru LPAI H5 a H7 jsou jedinečné z hlediska schopnosti adaptace na hostitele a vývoje na vysoce patogenní aviární influenzu (HPAI). Virové infekce HPAI vznikají de novo u drůbeže infikované subtypy LPAI H5 a H7 a díky velkému systémovému kolapsu se stávají rychle fatálními. VetMAX-Gold AIV Detection Kit umožňuje diagnostiku AIV u drůbeže.

Test sestává z jednojamkové/jednozkumavkové RT-PCR v reálném čase, při které dochází k reverzní transkripci RNA na cDNA; dvě cílové virové matrice a jeden cílový nukleoprotein jsou amplifikovány a detekovány v reálném čase pomocí fluorescenčních sond TaqMan™ (hydrolyzační sondy). Test detekuje sekvence, které jsou společné pro všechny subtypy AIV. Souprava obsahuje:

* Reagencii Influenza Virus-Xeno RNA Control Mix, která slouží jako pozitivní kontrola pro složky RT-PCR v reálném čase a používá se také k nastavení prahové hodnoty cyklu (Ct) pro hodnocení výsledků testu.
* Reagencii Xeno™ RNA Control, která slouží jako interní pozitivní kontrola pro purifikaci RNA a ke sledování přítomnosti inhibitorů PCR.
* Reagencii Influenza Virus Primer Probe Mix, která je optimalizována pro multiplexní real-time RT-PCR amplifikaci Xeno RNA Control a cílových sekvencí RNA AIV.

Omezení

* Souprava není určena k diferenciaci subtypů AIV.
* Zacházejte se vzorky podle doporučení v [Tabulka 2](#bookmark33), abyste zabránili degradaci jakékoli přítomné RNA AIV.
* Metody extrakce RNA by měly poskytnout RNA bez inhibitorů RT-PCR, které mohou bránit amplifikaci cílové RNA.
* Dodržujte [„Správnou laboratorní praxi pro PCR a RT-PCR“ na straně](#bookmark75)6, aby se zabránilo falešně pozitivním amplifikacím v důsledku kontaminace testovaných vzorků PCR produkty.

**Obsah a skladování**

Souprava obsahuje reagencie pro 100 25μl RT-PCR testů v reálném čase.

**Tabulka 1 VetMAX-Gold AIV Detection Kit**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Složka** | **Množství** | **Skladování** |
| 2X Multiplex RT-PCR Buffer | 1.375 mL | -30°C to -10°C |
| Multiplex RT-PCR Enzyme Mix | 280 μL |
| Influenza Virus Primer Probe Mix | 110 μL |
| Xeno RNA Control (10,000 copies/pL) | 250 μL |
| Influenza Virus-Xeno RNA Control Mix (1,000 copies/pL) | 80 μL |
| Nuclease-free Water | 1.75 mL | -30°C to 25°C |

**Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky**

|  |  |
| --- | --- |
| **Položka** | **Zdroj[1]** |
| **Přístroj pro PCR v reálném čase, jeden z následujících:** | |
| 7500 Fast Real-Time PCR System (96-well), running SDS Software v1.4  7500 Fast Precision Plate Holder, for 0.1 mL tube strips (kat. č. A29252) nebo ekvivalentní | Kontaktujte místní obchodní kancelář. |
| Systém QuantStudio 5 Real-Time PCR, 96jamkový, 0,1 ml | Kontaktujte místní obchodní kancelář. |
| **Zařízení** | |
| Mikrocentrifuga | MLS |
| Laboratorní míchačka (třepačka vortex nebo ekvivalentní) | MLS |
| Pipetory bez nukleáz | MLS |
| 2 nádoby na led:   * Jedna pro oblast nastavení PCR, kde je připraven master mix * Jeden pro oblast, kde může být přítomna RNA | MLS |
| **Destičky nebo zkumavky a víčka** | |
| MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL | 4366932 (200 destiček), 4346906 (20 destiček) nebo ekvivalent |
| MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL | 4346907 |
| MicroAmp Optical Adhesive Film | 4311971 (100 krytů), 4360954 (25 krytů) nebo ekvivalent |
| MicroAmp Fast 8-Tube Strip, 0.1 mL | 4358293 nebo ekvivalent |
| MicroAmp Optical 8-Cap Strips | 4323032 nebo ekvivalent |
| **Další spotřební materiál a reagencie** | |
| Filtrované pipetovací špičky | [thermofisher.com/pipettetips](http://www.thermofisher.com/pipettetips) |
| Reagenční zkumavky prosté nukleáz pro přípravu master mixů | MLS |
| 1X Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7,4 | MLS |
| Viral Transport Media | MLS |

[1] Není-li uvedeno jinak, jsou všechny materiály k dispozici na stránce [thermofisher.com](http://www.thermofisher.com). „MLS“ znamená, že materiál je dostupný od [fisherscientific.com](http://fisherscientific.com) nebo od jiného významného laboratorního dodavatele.

**Izolujte RNA ze vzorků**

**Tabulka 2 Doporučení pro manipulaci se vzorky**

|  |  |
| --- | --- |
| **Krok nebo proces** | **Doporučení** |
| Přeprava/skladování vzorků | Vzorky získané orofaryngeálním / tracheálním výtěrem přepravujte při teplotě 4 °C až 25 °C nebo v souladu s pokyny výrobce. |
| Příprava vzorků získaných výtěrem | 1. Vložte jeden vzorek orofaryngeálního / tracheálního výtěru do zkumavky o objemu 1,5 ml nebo do 96jamkové destičky s hlubokými jamkami, poté přidejte 0,75 ml reagencie Viral Transport Media. 2. Promíchejte důkladně na třepačce 3 minuty a poté proveďte pulzní odstředění pro odstranění drti z uzávěru zkumavky. 3. Odeberte 50 μl supernatantu pro izolaci RNA. |
| Příprava vzorově purifikovaných vzorků (pro použití v extrakčních kontrolách pro PCR) | Připravte v duplikátu vzorově purifikované vzorky s použitím 1X PBS jako výchozího materiálu. Zpracujte pomocí stejné metody izolace RNA, jaká se používá pro testované vzorky. |
| Navržená metoda izolace RNA | MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit (kat. č. AM1836, AMB1836-5) nebo ekvivalentní metoda izolace RNA. |
| Požadované modifikace metody izolace RNA | * Přidejte 2 μl neředěné reagencie Xeno RNA Control na každou izolaci do lyzačního roztoku použitého pro izolaci RNA. * Přidejte do lyzačního roztoku carrier RNA podle doporučení výrobce. Carrier RNA je poskytována v soupravě MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit (kat. č. AM1836, AMB1836-5). |

**Proveďte RT-PCR v reálném čase**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | Určete množství reakcí a rozmrazte reagencie | a. Na každou destičku proveďte následující kontrolní reakce (viz  [„Nastavení a spuštění přístroje pro PCR](#bookmark37)  [v reálném čase“ na straně 3)](#bookmark37):   * Pozitivní kontrola (připravte reakce v duplikátu); použijte 8 μl reagencie Influenza Virus-Xeno™ RNA Control Mix (1 000 kopií/μl). * No-template control (beztemplátová kontrola, NTC) (připravte reakce v duplikátu); místo vzorku RNA použijte vodu bez nukleáz.   b. Naplánujte rozložení destiček tak, aby jamky obsahující NTC byly umístěny co nejdále od pozitivních kontrol a testovaných vzorků, aby nedošlo k náhodné křížové kontaminaci.  c. Rozmrazte reagencie RT-PCR master mix v jedné nádobě na led a kontroly a vzorky v jiné nádobě na led. Promíchejte důkladně obsah každé zkumavky opatrným protřepáním na třepačce, poté krátce centrifugujte, aby se roztok zachytil na dně zkumavky. Reagencie udržujte na ledu. | | |
| 2 | Připravte RT-PCR master mix na ledu | | Zkombinujte níže uvedené složky pro požadovaný počet reakcí s plus 10% přebytek jako rezervu. | |
| **Složka** | **Objem na 25μl reakci** |
| 2X Multiplex RT-PCR Buffer | 12,5 μl |
| Multiplex RT-PCR Enzyme Mix | 2,5 μl |
| Influenza Virus Primer Probe Mix | 1,0 μl |
| Voda bez nukleáz | 1,0 μl |
| **Celkový objem RT-PCR master mix** | **17,0 μl** |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 3 | Nastavte reakce RT-PCR | 1. Do příslušných jamek na PCR destičce nebo do PCR zkumavek udržovaných na ledě nadávkujte po 17 μl master mixu RT-PCR. 2. Přidejte příslušnou složku pro daný typ reakce podle následující tabulky: | | | |
|  |  |  | **Typ reakce** | **Složka** | **Objem na reakci** |
| Zkušební vzorek | Vzorková RNA | 8,0 μl |
| NTC | Voda bez nukleáz | 8,0 μl |
| Pozitivní kontrola | Influenza Virus-Xeno RNA Control Mix (1 000 kopií/μl) | 8,0 μl |
| Extraction control (extrakční kontrola) | Vzorově purifikovaný vzorek PBS | 8,0 μl |
|  |  | 1. Každou reakční nádobu uzavřete, promíchejte a poté krátce centrifugujte, aby se obsah dostal na dno. | | | |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 4 | Nastavte a spusťte přístroj pro PCR v reálném čase | Podrobné informace o nastavení a spuštění přístroje naleznete v příslušné dokumentaci k vašemu přístroji.   1. Nastavte cyklus podle pokynů výrobce za použití následujících parametrů:  * Typ experimentu: Standardní křivka * Režim run: Standard * Reakční objem: 25 μl * ROX pasivní referenční barvivo: Obsaženo v pufru RT-PCR * TaqMan™ zářiče a zhášeče: | | | | | | | |
|  |  |  | **Cílová struktura** | **Reportér** | | | | **Quencher** | |
| AIV | Barvivo FAM[1] | | | | Eclipse™ Q | |
| Xeno™ RNA Control | Barvivo VIC[2] | | | | Eclipse™ Q | |
|  |  |  | [1] Absorbanční maximum 495 nm; emisní maximum 520 nm.  [2] Absorbanční maximum 540 nm; emisní maximum 552 nm. | | | | | | |
|  |  | 1. Spusťte program termocykleru a sbírejte data z amplifikace v reálném čase během fáze 3. Použijte následující nastavení termocykleru: | | | | | | | |
|  |  |  | **Fáze** | | | **Opakování** | **Teplota** | | **Čas** |
| Reverzní transkripce | | 1 | 1 | 48 °C | | 10 minut |
| Inaktivace RT / počáteční denaturace | | 2 | 1 | 95 °C | | 10 minut |
| Amplifikace | | 3 | 40 | 95 °C | | 15 sekund |
|  |  |  |  | |  |  | 60 °C | | 45 sekund |

**Analýza dat**

Přečtete si pokyny pro analýzu vašich dat v uživatelské příručce k přístroji pro PCR v reálném čase pomocí následující metody.

**Tabulka 3 Analýza dat**

|  |  |
| --- | --- |
| **Metoda** | **Podrobnosti** |
| Pro analýzu dat použijte nastavení **Control-Based Threshold**. | 1. Vyberte **Manual CT**. 2. Exportujte hodnoty ΔRn pro pozitivní kontrolní vzorky (Influenza Virus-Xeno RNA Control, 1 000 kopií/μl). 3. Průměrné hodnoty barviv FAM a VIC (samostatně) pro ΔRn v cyklu 40 pro všechna opakování pozitivní kontrolní reakce. 4. Nastavte práh pro reakce RNA AIV na 5 % průměrné maximální hodnoty fluorescence AIV RNA amplifikačního signálu v pozitivních kontrolních reakcích.   Příklad: Pokud je průměrná maximální hodnota fluorescence pro cílovou RNA AIV v pozitivních kontrolních reakcích 3,0, nastavte práh RNA AIV na 0,15.   1. Opakujte krok 4 pro cílovou sekvenci Xeno RNA Control s použitím prahové hodnoty 5 %.   Příklad: Pokud je průměrná maximální hodnota fluorescence pro cílovou Xeno™ RNA v pozitivních kontrolních reakcích 2,0, nastavte práh Xeno™ RNA na 0,1. |
| Zkontrolujte nezpracovaná data z fluorescence. | Ověřte, zda je zvýšená fluorescence pozorovaná v normalizovaných datech zjevná i bez matematického zpracování dat. |

**Interpretace výsledků testu**

Před analýzou výsledků zkušebního vzorku ověřte, zda je cyklus RT-PCR v reálném čase platný.

**Tabulka 4 Kritéria platného cyklu RT-PCR v reálném čase**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Typ reakce** | **Hodnota Ct pro AIV RNA** | **Hodnota Ct pro Xeno™ RNA Control** |
| Pozitivní kontrola | 25-29 | 25-29 |
| NTC | Nezjištěno[1] | Nezjištěno[1] |
| Extraction control (extrakční kontrola) | Nezjištěno[1] | 27,5-34 |

[1] Pokud je hodnota Ct < 40, viz [“Řešení problémů” na straně 6](#bookmark75).

**Tabulka 5 Interpretace výsledků testovaných vzorků**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Hodnota Ct pro AIV RNA** | **Hodnota Ct pro Xeno™ RNA** | **Interpretace** |
| < 38 | 27,5-34[1] | AlV-pozitivní vzorek |
| Nezjištěno | 27,5-34 | AlV-negativní vzorek |
| 38-40 | 27,5-34[2] | Suspektní výsledek[2] |

[1] Viz [„Řešení problémů“ na straně 6](#bookmark75).

[2] Viz [Tabulka 6](#bookmark44).

**Tabulka 6 Hodnocení suspektních výsledků**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Výsledek** | **Opatření** | |
| **Suspektní výsledek:** Hodnota Ct AIV pro vzorek je 38-40. | Analyzujte suspektní vzorky RNA na přítomnost / nepřítomnost inhibitorů RT-PCR výpočtem posunu Ct pro Xeno RNA:  **Posun Xeno RNA Ct = SS - XEC**, kde:  **SS** = hodnota Ct pro Xeno RNA v suspektním vzorku  **XEC** = průměrná hodnota Ct pro Xeno™ RNA v extrakčních kontrolách | |
| **Pracovní postup A**  **Posun Ct pro Xeno RNA > 1,5** | **Pracovní postup B**  **Posun Ct pro Xeno RNA < 1,5** |
| 1. Opakujte RT-PCR v reálném čase s použitím 2 μl suspektního vzorku RNA. (V RNA mohou být přítomny inhibitory RT-PCR). Pokud je hodnota AIV Ct:  * < 38: Vzorek je AIV-pozitivní. Není zapotřebí žádné další testování. * > 38: Pokračujte kroky 2 až 5 tohoto postupu.  1. Zřeďte původní diagnostický vzorek v poměru 1: 4. 2. Opakujte purifikaci RNA v triplikátu na alikvotech zředěného vzorku. 3. Opakujte RT-PCR v reálném čase s použitím 8 μl purifikované RNA z kroku 3. 4. Stanovte počet vzorků s hodnotou AIV Ct < 40:  * 0 ze 3: AIV negativní * 1 ze 3: Presumptivně pozitivní; potvrďte sekundární zkušební metodou * > 2 ze 3: AIV pozitivní | 1. Opakujte purifikaci RNA v triplikátu na alikvotech původního diagnostického vzorku. 2. Opakujte RT-PCR v reálném čase s použitím 8 μl purifikované RNA z kroku 1. 3. Stanovte počet vzorků s hodnotou AIV Ct < 40:  * 0 ze 3: AIV negativní * 1 ze 3: Presumptivně pozitivní; potvrďte sekundární zkušební metodou * > 2 ze 3: AIV pozitivní |

**Konfirmační testování**

Všechny vzorky, které poskytnou pozitivní nebo presumptivně pozitivní výsledek testu pomocí soupravy VetMAX-Gold AIV Detection Kit by měly být odeslány do národní laboratoře (nebo rovnocenné autorizované laboratoře) ke konfirmačnímu testování.

**Odstraňování problémů**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Zjištění** | **Možná příčina** | **Doporučené opatření** |
| **Pozitivní kontrolní reakce:**  Influenza Virus-Xeno RNA Control: žádný signál  Xeno RNA Control: žádný signál | S reagencií Influenza Virus-Xeno RNA Control Mix bylo nesprávně zacházeno, což vedlo k degradaci RNA. | Při manipulaci s kontrolními RNA uplatňujte vhodná opatření proti kontaminaci RNázou. Například používejte čisté rukavice a špičky bariérové pipety bez nukleázy. |
| Reagencie Multiplex RT-PCR Enzyme Mix byla nesprávně skladována nebo s ní bylo nesprávně manipulováno, a následně ztratila aktivitu. | Opakujte RT-PCR s použitím čerstvých reagencií. |
| Termocykler nebyl správně nastaven. | Zkontrolujte nastavení termocykleru. Viz [„Nastavení a spuštění přístroje pro PCR](#bookmark37) [v reálném čase“ na straně 3](#bookmark37). |
| RT-PCR master mix byl připraven nesprávně. | Opakujte test se správně připraveným RT-PCR master mixem. |
| **NTC nebo reakce extrakční kontroly:**  Hodnota Ct je < 40 | Během extrakce RNA nebo PCR došlo ke kontaminaci. | * Opakujte izolaci RNA nebo RT-PCR v reálném čase s použitím čerstvých reagencií a s čerstvě dekontaminovanými pipetami. * Nastavte RT-PCR v reálném čase v oblasti oddělené od oblastí používaných pro izolaci RNA a analýzu PCR produktů. |
| **Zkušební vzorky:**  Xeno RNA Control: nebo nízký signál  AIV RNA: vysoký signál | Primery a sonda Xeno RNA Control jsou v RT-PCR v limitujících koncentracích. Vysoké hladiny AIV RNA ve vzorku mohou redukovat amplifikaci Xeno RNA Control. | V reakci, která má silný signál pro RNA AIV, se neočekává žádný nebo jen nízký signál Xeno™ RNA Control. |
| **Zkušební vzorky:**  Xeno RNA Control: žádný signál  AIV RNA: žádný signál nebo signál v suspektním rozmezí | Nízký zisk RNA. | * Zkontrolujte hodnoty Ct pro Xeno RNA Control ve vzorově purifikovaných vzorcích. * Hodnota Ct >38: znamená, že reagencie Xeno RNA Control byla vynechána nebo že byl nízký zisk RNA. * Opakujte purifikaci RNA původního diagnostického vzorku. |
| Vzorky RNA obsahují inhibitory RT-PCR. | Viz [Tabulka 6](#bookmark44). |

**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.

**Dokumentace a podpora**

Zákaznická a technická podpora

Ve Spojených státech amerických volejte 1-800-955-6288.

Navštivte [**thermofisher.com/support**](http://thermofisher.com/support)pro nejnovější služby a podporu:

* Mezinárodní kontaktní telefonní čísla
* Podpora produktů
* Objednávková a webová podpora
* Dokumentace výrobku