**Souprava VetMAX Ruminant Respiratory Screening**

TaqMan RT-PCR v reálném čase pro detekci 7 hlavních patogenů, které způsobují respirační onemocnění u přežvýkavců (*Mycoplasma bovis, Histophilus somni, Pasteurella multocida, Mannheimia haemolytica*, bovinní *Coronavirus*, bovinní respirační syncitiální virus, bovinní *parainfluenza*-3 virus)

**Katalogové číslo** SRPR

**Publikace č.** MAN0008879 **Rev**. B.0

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Technologie** | **Druhy** | **Nukleová kyselina izolovaná z matric** | **Typ testu** |
| RT-PCR v reálném čase (DNA/RNA)   * 7 duplexní * Endogenní IPC | Skot | Nosní a tracheální výtěry  Tracheální a bronchoalveolární tekutina  Plíce | Individuální |

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\uzivatel\AppData\Local\Temp\FineReader11.00\media\image1.jpeg | **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.** |
|  |  |
| C:\Users\uzivatel\AppData\Local\Temp\FineReader11.00\media\image1.jpeg | **VAROVÁNÍ! POTENCIÁLNÍ BIOLOGICKÉ NEBEZPEČÍ**. Přečtěte si bezpečnostní informace o biologickém nebezpečí na stránce daného výrobku na adrese **termofisher.com**. Používejte vhodné ochranné brýle, oděv a rukavice. |

**Informace o výrobku**

**Popis výrobku**

Souprava **Applied Biosystems VetMAX Ruminant Respiratory Screening** je molekulárně diagnostický nástroj pro detekci agens, která způsobují hlavní respirační onemocnění u skotu (*M. bovis, H. somni, P. multocida, M. haemolytica*, bovinní *Coronavirus*, bovinní respirační syncitiální virus, bovinní *parainfluenza* 3) pomocí PCR v reálném čase.

Každý vzorek nukleové kyseliny získaný po extrakci je analyzován v 7 jednotlivých jamkách; každá jamka se používá ke specifické detekci nukleové kyseliny daného patogenu a IPC (Internal Positive Control). Pozitivní IPC odráží účinnost extrakce a nepřítomnost inhibitoru ve vzorcích.

Může být použita na nukleové kyseliny extrahované z **nosních a tracheálních výtěrů a tracheálních, bronchoalveolárních a plicních tekutin**.

Kompletní protokoly pro extrakci nukleových kyselin z těchto matric jsou k dispozici na vyžádání od Technické podpory.

**Obsah soupravy a skladování**

Souprava **VetMAX Ruminant Respiratory Screening** obsahuje složky, které lze použít k detekci těchto 7 patogenů a IPC. Po převzetí má být celá souprava skladována při teplotě **-30 °C až -10 °C.** Po prvním použití složky uložte soupravu podle následujících doporučení:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Složka** | **Popis** | **Objem (25 reakcí)** | **Skladování** | |
| **Po obdržení** | **Po prvním použití** |
| 3 - Mix SRPR *M. bovis*  (Zelená zkumavka) | 7 mixů pro TaqMan RT-PCR. Každý z nich obsahuje:   * Detekční systém pro cílovou strukturu patogenu, včetně sondy TaqMan nesoucí označení **FAM - NFQ** (nefluorescenční zhášeč). * Detekční systém pro IPC, včetně sondy TaqMan nesoucí označení **VIC - NFQ** (nefluorescenční zhášeč). * Pufr, reverzní transkriptáza a enzym pro PCR v reálném čase. | 500 μl | -30 °C až -10 °C | -30 °C až -10 °C |
| 3 - Mix SRPR *H. somni*  (Žlutá zkumavka) | 500 μl | -30 °C až -10 °C | -30 °C až -10 °C |
| 3 - Mix SRPR *P. multocida*  (Modrá zkumavka) | 500 μl | -30 °C až -10 °C | -30 °C až -10 °C |
| 3 - Mix SRPR *M. haemolytica*  (Oranžová zkumavka) | 500 μl | -30 °C až -10 °C | -30 °C až -10 °C |
| 3 - Mix SRPR Corona  (Červená zkumavka) | 500 μl | -30 °C až -10 °C | -30 °C až -10 °C |
| 3 - Mix SRPR RSV  (Černá zkumavka) | 500 μl | -30 °C až -10 °C | -30 °C až -10 °C |
| 3 - Mix SRPR bPI3  (Fialová zkumavka) | 500 μl | -30 °C až -10 °C | -30 °C až -10 °C |
| 4a - EPC SRPR  (Hnědá zkumavka) | **External Positive Control (Externí pozitivní kontrola):**  Pozitivní kontrola pro 7 patogenů. Sestává z **již extrahované** nukleové kyseliny, která má být amplifikována během PCR v reálném čase. | 360 ul | -30 °C až -10 °C | -30 °C až -10 °C |

**Extrakční a amplifikační kontroly**

**Souprava VetMAX Ruminant Respiratory Screening** obsahuje jednu kontrolu, která se používá k validaci amplifikace nukleové kyseliny.

**4a - EPC SRPR: pathogen target positive control (pozitivní kontrola cílového patogenu)**

**Již extrahovaná** pozitivní kontrola, která má být amplifikována během PCR v reálném čase.

Pozitivní výsledek v rámci specifikovaného rozsahu Ct umožňuje u každého patogenu validovat amplifikaci cílového patogenu pomocí RT-PCR v reálném čase.

Ověření extrakce nukleové kyseliny pro každý vzorek se provádí detekcí **endogenous IPC** (Internal Positive Control) (**endogenní IPC** (Interní pozitivní kontroly)) **přítomné v každém vzorku**.

Pozitivní výsledek IPC s vyhovující hodnotou ve vzorku validuje extrakci tohoto vzorku, ať už pozitivního nebo negativního pro cílový patogen: eliminace falešně negativních výsledků a ověření účinku inhibitoru.

**Pro konfirmaci správné analýzy doporučujeme zahrnout dvě negativní kontroly:**

**NCS: negative extraction control (NCS: negativní extrakční kontrola)**

Tato kontrola sestává z reagencií použitých při extrakci bez přidání vzorku (objem vzorku může být nahrazen pufrem použitým při přípravě vzorku nebo vodou bez DNázy/RNázy), které procházejí stejným zpracováním jako vzorky: extrakcí nukleových kyselin a RT-PCR v reálném čase.

Negativní výsledek pro cílový patogen a endogenní IPC potvrzuje nepřítomnost kontaminace během extrakce a RT-PCR v reálném čase.

**NC: negative amplification control (NC: negativní amplifikační kontrola)**

Tato kontrola sestává z amplifikačního mixu přidaného na destičku během přípravy RT-PCR v reálném čase, a dále z 5 μl vody bez DNázy / RNázy pro doplnění objemu reakce na 25 μl.

Negativní výsledek pro daný patogen potvrzuje absenci kontaminace během přípravy PCR reakce v reálném čase.

**Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky**

Pokud není uvedeno jinak, jsou všechny materiály k dispozici na stránce **thermofisher.com**.

* Vysoce přesné mikropipety (rozmezí od 1 μl do 1000 μl) s filtrovanými špičkamibez DNázy/RNázy.
* DNase/RNase-free water (Voda bez DNázy/RNázy)
* 1X TE pufr
* 1X PBS pufr
* Termocykler pro PCR v reálném čase schopný detekovat následující fluorofory:
* FAM (emisní maximum: λ515 nm)
* VIC (emisní maximum: λ554 nm)
* Spotřební materiál potřebné optické kvality kompatibilní s použitým termocyklerem:
* 96-jamkové PCR destičky, PCR stripy (8 nebo 12 jamek), mikrozkumavky nebo kapiláry
* Vhodné kryty destiček nebo víčka pro zakrytí

**Postup analýzy**

Reakční objem PCR v reálném čase je 25 μl:

* **3 - Mix SRPR Pathogen**: 20 μl na analýzu
* **Extrahovaná DNA:** 5 μl na analýzu a na mix

**Extrakce nukleové kyseliny**

Nukleová kyselina musí být extrahována ze vzorků před RT-PCR analýzou v reálném čase.

**POZNÁMKA**: Pro informace o metodách extrakce, které jsou kompatibilní se soupravou VetMAX Ruminant Respiratory Screening a které jsou pro ni validovány, kontaktujte oddělení technické podpory.

**Příprava RT-PCR v reálném čase**

1. Vytvořte plán analýzy pro distribuci mixů a vzorků. Je-li to možné, uchovávejte pozitivní kontrolu (EPC) odděleně od ostatních vzorků.
2. U každého mixu použitého pro analýzu:
3. Rozmrazte zkumavku s reagencií **3 - Mix SRPR pathogen** při teplotě mezi **2 °C a 8 °C**, na ledu nebo v chlazeném stojanu.
4. Zkumavku s reagencií **3 - Mix SRPR** promíchejte opatrným protřepáním a poté krátce centrifugujte.
5. Přidejte po **20 μl mixu 3 - Mix SRPR** do každé použité jamky PCR destičky, PCR stripu nebo kapiláry.
6. Přidejte vzorek a kontrolní nukleovou kyselinu do každého reakčního mixu podle předem definovaného plánu analýzy:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Typ analýzy** | **Složka** | **Objem vzorku** |
| Vzorek pro analýzu | Nukleová kyselina extrahovaná ze vzorku | 5 μl |
| Positive amplification control (Pozitivní amplifikační kontrola) | **4a - EPC SRPR** | 5 μl |
| Negative extraction control (Negativní extrakční kontrola) (NCS) | Extrahovaná NCS | 5 μl |
| Negative amplification control Negativní amplifikační kontrola (NC) | DNase/RNase-free water (Voda bez DNázy/RNázy) | 5 μl |

1. Zakryjte PCR destičku, PCR stripy nebo kapiláry adhezivním víčkem destičky nebo vhodnými uzávěry.

**Amplifikace RT-PCR v reálném čas**

1. Na termocykleru vytvořte následující detektory:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Reportér** | **Quencher** |
| MB, HS, PM, MH, BCOV, RSV, BPI3 | FAM | NFQ (nefluorescenční zhášeč) |
| IPC SRPR | VIC | NFQ (nefluorescenční zhášeč) |
| Pasivní reference: ROX(1) | | |

(1)Fluorofor ROX™ musí být zadán pro analýzu RT-PCR v reálném čase, pokud je termocykler schopen jej detekovat. Nepřítomnost detekce tohoto fluoroforu u ostatních termocyklerů neohrožuje analýzu RT-PCR v reálném čase.

1. Přiřaďte detektor **odpovídajícího** patogenu a **IPC SRPR** detektor ke každé jamce se vzorkem použité v analýze.
2. Pro analýzu nastavte následující program RT-PCR v reálném čase:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Opakování kroků** | **Teplota** | **Doba trvání** |
| Krok 1 | x 1 | 45 °C | 10 minut |
| Krok 2 | x1 | 95 °C | 10 minut |
| Krok 3 | x45 | 95 °C | 15 sekund |
| 60 °C(1) | 1 minuta |

(1) Sběr dat fluorescence během jednominutové fáze při teplotě 60 °C.

1. Vložte PCR destičku, PCR stripy nebo kapiláry do termocykleru a spusťte RT-PCR v reálném čase.

**Analýza výsledků**

**Analýza surových dat**

Pro analýzu surových dat postupujte podle doporučení výrobce termocykléru.

1. Prahové limity nastavte odděleně pro každý cíl RT-PCR v reálném čase.
2. Pro každý detektor interpretujte výsledky podle hodnot Ct vzorku získaných podle doporučení níže.

**Validace**

Test je validován, pokud jsou splněna následující kritéria:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Detektor patogenu** | **IPC SRPR detektor** | **Validace** |
| EPC SRPR | Ct = Ct QC Pathogen **4a - EPC SRPR** ± 3Ct(1) | Ct < 45 nebo Ct > 45(2) | RT-PCR validována |
| NCS | Ct > 45 | Ct > 45 | Validováno pro extrakci |
| NC | Ct > 45 | Ct > 45 | PCR složky validovány |

(1) Viz hodnoty uvedené v oddílu 2.1 „EPC“, certifikátu o analýze šarže použité pro daný test.

2) Hodnota IPC v EPC by se neměla použít k validaci testu.

**Interpretace výsledků**

Pro každý analyzovaný vzorek by měly být výsledky interpretovány takto:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Detektor patogenu** | **IPC SRPR detektor** | **Interpretace** |
| Ct < 45 | Ct < 45 nebo Ct > 45 | Cílový patogen detekován |
| Ct > 45 | Ct < 45 | Cílový patogen nedetekován |
| Ct > 45 | Ct > 45 | Nevalidováno(1) |

(1) Vzorek bude vrácen jako nevalidovaný z důvodu negativní IPC.

**Postup pro zacházení s nevalidovanými vzorky**

**Pokud vzorek není validován pouze pro určité mixy:**

1. Proveďte novou analýzu RT-PCR na 5 μL vzorku čisté nukleové kyseliny za použití dotyčných mixů.
2. Pro každý mix platí: je-li nukleová kyselina pozitivní na patogen nebo negativní na patogen s vyhovujícím výsledkem IPC, je získaný výsledek validován pro daný mix.
3. Pokud výsledek stále není validován pro určité mixy, nařeďte nukleovou kyselinu, jak je popsáno níže (v případě vzorku nevalidovaného pro všechny mixy), ale dodržujte tento postup pouze pro příslušné mixy.

**Pokud vzorek není validován pro všechny mixy:**

1. Nařeďte nukleovou kyselinu nevalidovaného vzorku v poměru 1 : 10 pomocí 1X TE pufru.
2. Proveďte RT-PCR analýzu na 5 μl tohoto ředění.
3. Pokud je dané ředění pozitivní nebo negativní na cílový patogen s vyhovujícím výsledkem IPC, je získaný výsledek validován pro dotyčný mix.
4. Pokud výsledek stále není validován pro určité mixy, extrahujte vzorek znovu s předběžným naředěním 1 : 10 v 1X PBS pufru před extrakcí a znovu testujte všechny použité mixy.

**Dokumentace a podpora**

**Zákaznická a technická podpora**

Technická podpora: navštivte **thermofisher.com/askaquestion**

Navštivte **thermofisher.com/support** pro nejnovější služby a podporu:

* Mezinárodní kontaktní telefonní čísla
* Objednávková a webová podpora
* 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.