**Souprava VetMAX BRSV PI3**

**Návod k použití**

TaqMan RT-PCR v reálném čase pro detekci bRSV (bovinního respiračního syncyciálního viru) a PI3 (viru *parainfluenzy* typu 3)

**Katalogové číslo** TRSVPI350

**Publikace č.** MAN0008895 **Rev**. B.0

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Technologie** | **Druhy** | **Nukleová kyselina izolovaná z matric** | **Typ testu** |
| Real-time RT-PCR (RNA)* Triplexní
* Endogenní IPC
 | Skot | Výtěr (nasofaryngeální a tracheální)Orgány (plíce)Transtracheální aspiraceBronchoalveolární laváž | Individuální nebo sdružený(podle typu vzorku) |

|  |  |
| --- | --- |
| 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.** |
|  |  |
| C:\Users\uzivatel\AppData\Local\Temp\FineReader11.00\media\image1.png | **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 BRSV PI3**, vyvinutá ve spolupráci s Laboratoire d'Analyses Sèvres Atlantique (LASAT), je molekulárně diagnostický nástroj pro detekci bRSV (bovinního respiračního syncyciálního viru) a PI3 (viru *parainfluenzy* typu3) pomocí PCR v reálném čase.

Virus bRSV je považován za hlavní příčinu postižení hlubokého respiračního systému u telat mladších 2 let. Nemoc, která odpovídá primární infekci, způsobuje významné hospodářské ztráty v chovu hospodářských zvířat a její dopad je maximální na podzim a v zimě. PI3 je jediný virus *parainfluenzy,* který má klinický význam u přežvýkavců. Virus vykazuje tropismus k plicní tkáni a má za následek mírné klinické příznaky, pokud nedojde k sekundární infekci.

Každý vzorek RNA získaný po extrakci je analyzován v jedné jamce: stejná jamka je použita ke specifické detekci virové RNA viru bRSV, virové RNA viru PI3 a IPC (Internal Positive Control) (Interní pozitivní kontroly). Pozitivní IPC odráží účinnost extrakce a nepřítomnost inhibitoru ve vzorcích.

Je určený pro virovou RNA extrahovanou z **výtěrů (nazofaryngeálních a tracheálních), plic, ze vzorků získaných transtracheální aspirací (TTA)** a **bronchoalveolární laváží (BAL).** Při extrakci nukleové kyseliny lze použít sdružený vzorek ze tří až pěti výtěrů.

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

**Obsah soupravy a skladování**

Souprava **VetMAX BRSV PI3** obsahuje složky, které lze použít k triplexní detekci bRSV, PI3 a IPC. Po převzetí musí být celá souprava uložena při teplotě **-30 °C až -10 °C**. Po prvním použití složky uložte soupravu podle následujících doporučení:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Složka** | **Popis** | **Objem (50 reakcí)** | **Skladování** |
| **Po obdržení** | **Po prvním použití** |
| 3 - Mix BRSV/PI3(Zelená zkumavka) | Mix pro TaqMan RT-PCR. Obsahuje:* Detekční systém pro cílovou strukturu bRSV, včetně sondy TaqMannesoucí označení **FAM - NFQ** (nefluorescenční zhášeč).
* Detekční systém pro cílovou strukturu PI3, včetně sondy TaqMan nesoucí označení **VIC - NFQ** (nefluorescenční zhášeč).
* Detekční systém pro IPC, včetně sondy TaqMan nesoucí označení **Cyanine Red – NFQ** (nefluorescenční zhášeč).
* Pufr, reverzní transkriptáza a enzym pro PCR v reálném čase.
 | 2 x 500 μl | -30 °C až -10 °C | -30 °C až -10 °C |
| 4a - EPC BRSV/PI3(Hnědá zkumavka) | **External Positive Control (Externí pozitivní kontrola):**bRSV a PI3 pozitivní kontrola. Sestává z **již extrahované** nukleové kyseliny pro amplifikaci během RT-PCR v reálném čase. | 90 μl | -30 °C až -10 °C | -30 °C až -10 °C |

**Extrakční a amplifikační kontroly**

Souprava **VetMAX BRSV PI3** obsahuje jednu kontrolu, která umožňuje validovat amplifikaci virové RNA.

**4a - EPC BRSV/PI3: bRSV and PI3 positive control (bRSV a PI3 pozitivní kontrola)**

**Již extrahovaná** pozitivní kontrola pro amplifikaci během RT-PCR v reálném čase.

Pozitivní výsledek v rámci specifikovaného rozsahu Ct validuje amplifikaci cílových struktur bRSV a PI3 pomocí PCR v reálném čase.

Ověření extrakce nukleové kyseliny pro každý vzorek se provádí detekcí 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, a tím eliminuje falešně negativní výsledky a ověřuje účinek inhibitorů.

**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, konkrétně extrakcí nukleových kyselin a RT-PCR v reálném čase. Negativní výsledek pro bRSV, PI3 a pro endogenní IPC potvrzuje správný postup lýzy a nepřítomnost kontaminace během extrakce i RT-PCR v reálném čase.

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

Jedná se o amplifikační směs, která se nanáší na destičku během přípravy RT-PCR v reálném čase společně s 5 μl vody bez DNázy/RNázy pro doplnění objemu roztoku na 25 μl.

Negativní výsledek pro bRSV, PI3 a IPC potvrzuje nepřítomnost kontaminace během přípravy RT-PCR v reálném čase.

**Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky**

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

* Nastavitelné mikropipety (rozmezí od 1 μl do 1000 μl) s filtrovanými špičkami bez 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: λ 554 nm)
	+ Cyaninová červená (emisní maximum: λ 670 nm)
* Spotřební materiál potřebné optické kvality kompatibilní s 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 RT-PCR v reálném čase je 25 μl:

* **3 - Mix BRSV/PI3**: 20 μl na reakci
* **Extrahovaná RNA**: 5 μl na reakci

**Extrakce virové RNA**

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

**POZNÁMKA**: Pro informace o metodách extrakce, které jsou kompatibilní se soupravou VetMAX BRSV PI3 a které jsou pro ni validovány, kontaktujte technickou podporu.

**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. Rozmrazte zkumavku s reagencií **3 - Mix BRSV/PI3** při teplotě mezi **2 °C a 8 °C**, na ledu nebo v chlazeném stojanu.
3. Zkumavku s reagencií **Mix BRSV/PI3** promíchejte opatrným protřepáním a poté krátce centrifugujte.
4. Do každé použité jamky PCR destičky, PCR stripu nebo kapiláry přidejte po 20 μl reagencie **Mix BRSV/PI3**.
5. Přidejte RNA ze vzorků a kontrol do roztoku mixu pro RT-PCR v reálném čase podle následujícího předem nastaveného plánu analýzy:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Typ analýzy** | **Složka** | **Objem vzorku** |
| Vzorek pro analýzu | RNA extrahovaná ze vzorku | 5 μl |
| Positive amplification control (Pozitivní amplifikační kontrola) | **4a - EPC BRSV/PI3** | 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 pomocí RT-PCR v reálném čase**

1. Na termocykleru vytvořte následující detektory:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Reportér** | **Quencher** |
| RSV | FAM | NFQ (nefluorescenční zhášeč) |
| PI3 | VIC | NFQ (nefluorescenční zhášeč) |
| IPC TRSVPI3 | Cyaninová červeň | 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 **RSV** detektor, **IP3** detektor a **IPC TRSVPI3** 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 | x1 | 48 °C | 30 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.

**Interpretace výsledků**

**Analýza surových dat**

Pro analýzu surových dat postupujte podle doporučení výrobce termocykleru.

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:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **RSV detektor** | **PI3 detektor** | **IPC TRSVPI3 detektor** | **Validace** |
| EPC BRSV/PI3 | Ct = Ct QC RSV**4a - EPC BRSV/PI3** ± Ct (1) | Ct = Ct QC PI3**4a - EPC BRSV/PI3** ± Ct(1) | Ct < 45 nebo Ct > 45(2) | RT-PCR validována |
| NCS | Ct > 45 | Ct > 45 | Ct > 45 | Validováno pro extrakci |
| NC | Ct > 45 | Ct > 45 | Ct > 45 | Validováno pro PCR reagencie |

(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:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **RSV detektor** | **PI3 detektor** | **IPC TRSVPI3 detektor** | **Interpretace** |
| Ct < 45 | Ct < 45 | Ct < 45 nebo Ct > 45 | detekovány bRSV a PI3 |
| Ct < 45 | Ct > 45 | Ct < 45 nebo Ct > 45 | bRSV detekován / PI3 nedetekován |
| Ct > 45 | Ct < 45 | Ct < 45 nebo Ct > 45 | PI3 detekován / bRSV nedetekován |
| Ct > 45 | Ct > 45 | Ct < 45 | bRSV a PI3 nedetekovány |
| Ct > 45 | Ct > 45 | Ct > 45 | Nevalidováno(1) |

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

**Postup pro zacházení s nevalidovanými vzorky**

1. Nařeďte RNA v poměru 1:10 v 1X TE pufru.
2. Proveďte RT-PCR analýzu na 5 μl tohoto ředění.
3. Pokud je zředěná RNA pozitivní na bRSV nebo PI3 nebo negativní na bRSV nebo PI3 s vyhovujícím výsledkem IPC, je získaný výsledek validován.
4. Pokud je zředěná RNA negativní na bRSV nebo PI3 a současně je nevyhovující výsledek IPC, získaný výsledek stále není validován. V takovém případě opakujte extrakci nukleové kyseliny za použití vzorku, který je před extrakcí předem naředěn 1 : 10 v 1X PBS pufru.
5. Pokud výsledek stále není validován, opakujte analýzu na novém vzorku.

**Dokumentace a podpora**

**Zákaznická a technická podpora**

Technická podpora: navštivte [**thermofisher.com/askaquestion**](http://www.thermofisher.com/askaquestion)

Navštivte [**thermofisher.com/support**](http://www.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.

**Výrobce**:

Thermo Fisher Scientific LSI S.A.S.

6 allée des Ecureuils Parc Tertiaire du Bois Dieu

Lissieu 69380, Francie

**Držitel rozhodnutí o schválení:**

Life Technologies Czech Republic s.r.o.,

V Celnici 1031/4 110 00, Praha 1

Veterinární přípravek.

**Číslo schválení:** 065-20/C