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

Souprava VetMAX African Swine Fever Virus Detection Kit

TaqMan detekce viru afrického moru prasat pomocí PCR v reálném čase

**Katalogové číslo** A28809

**Číslo dokumentu** 100027918 **Pub. č.** MAN0010783 **Rev**. B.0

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Technologie** | **Druhy** | **Vzorky** | **Typ testu** |
| PCR v reálném čase (DNA)   * Duplexní test * Exogenní IPC |  | Krev | Individuální |
| Prase | Sérum | Sloučené vzorky (5 nebo 10 vzorků) |
|  | Tkáně | Individuální |

|  |  |
| --- | --- |
|  | **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)**.** |

**Popis výrobku**

Souprava pro detekci viru afrického moru prasat Applied Biosystems VetMAX (kat. č. A28809) umožňuje detekci viru afrického moru prasat (ASFV) v prasečí krvi, séru nebo tkání amplifikací genu AS72 P72 pomocí PCR v reálném čase.

Použitou metodou je jednojamková PCR v reálném čase, při které dochází k amplifikaci a detekci cílových sekvencí ASFV a exogenní interní pozitivní kontroly (IPC) pomocí fluorescenčních sond TaqMan.

Souprava obsahuje:

* 3 - Mix ASFV: Obsahuje primery, sondy TaqMan, pufr a enzym pro optimalizovanou duplexní amplifikaci cílových sekvencí ASFV a IPC pomocí PCR v reálném čase.
* 4a - EPC ASFV: DNA templát pro amplifikaci cílových sekvencí P72. Slouží jako externí pozitivní kontrola pro PCR reakci v reálném čase a používá se k nastavení prahové hodnoty cyklu (Ct) pro vyhodnocení výsledků testu.
* 5 - IPC ASFV: Interní pozitivní kontrola přidaná ke každému vzorku a kontrole v lyzačním kroku postupu extrakce DNA. Slouží jako kontrola procesu purifikace DNA a používá se ke sledování přítomnosti inhibitorů PCR.

**Obsah a skladování**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Složka** | **Množství[1]** | **Skladování[2]** |
| 3 - Mix ASFV | 2 x 1 000 μl | -30°C až -10°C |
| 4a - EPC ASFV | 2 x 90 μl |
| 5 - IPC ASFV | 1 x 500 μl |

[1] Postačuje pro 100 (sto) 25 μl PCR reakcí v reálném čase.

[2] Doba použitelnosti je uvedena na obalu.

**Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky**

Pokud není uvedeno jinak, jsou všechny materiály k dispozici na stránce [**thermofisher.com**](http://www.thermofisher.com). MLS: Fisher Scientific ([**fisherscientific.com**](http://fisherscientific.com)) nebo jiný významný dodavatel pro laboratoře.

|  |  |
| --- | --- |
| **Položka** | **Zdroj** |
| Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System | Kontaktujte místní obchodní kancelář. |
| 96jamková destička, stripové zkumavky (8- nebo 12-jamkové), mikrozkumavky nebo kapiláry kompatibilní s použitým termocyklerem | MLS |
| Pipety prosté nukleáz a pipetovací špičky s filtrem | MLS |
| Dvě nádoby na led nebo chlazené stojany:   * Jedna pro oblast nastavení PCR, kde je připraven hlavní mix pro PCR * Jeden pro oblast, kde se připravují vzorky DNA a kontroly | MLS |
| Kryty destiček nebo víčka kompatibilní s destičkami, stripové zkumavky, mikrozkumavky nebo kapiláry | MLS |
| Reagenční zkumavky prosté nukleáz pro přípravu master mixu | MLS |
| Voda bez nukleáz (nikoli ošetřena DEPC) | AM9939 |
| 1X TE pufr | MLS |

**Pracovní postup**

* U každého cyklu PCR v reálném čase zařaďte kontroly uvedené v části [„Nastavení PCR reakcí“ na straně 2](#bookmark46).
* Dodržujte  [„Správnou laboratorní praxi pro PCR a RT-PCR“ na](#bookmark90)  [straně 4](#bookmark90), aby se zabránilo falešně pozitivním výsledkům a kontaminaci testovaných vzorků PCR produkty.

**Požadavky na vstupní DNA**

Doporučujeme použít soupravu MagMAX Pathogen RNA/DNA Kit (kat. č. 4462359) pro extrakci DNA z biologických vzorků, ale po řádné validaci v laboratoři můžete použít i jiné vysoce kvalitní metody extrakce DNA. Dále připravte vzorově purifikovaný vzorek za použití vody bez nukleáz jako výchozí materiál a stejné metody izolace DNA použité pro testované vzorky.

**DŮLEŽITÉ!** Přidejte 5 μl 5 - IPC ASFV do lyzačního roztoku použitého pro izolaci DNA pro každý vzorek a každou extrakční kontrolu.

**Příprava**

1. Rozmrazte reagencie a vzorky:
2. Rozmrazte 3 - Mix ASFV v nádobě s ledem nebo v chlazeném stojanu.
3. Rozmrazte 4a - EPC ASFV, 5 - IPC ASFV a vzorky DNA v oddělené nádobě s ledem nebo v odděleném chlazeném stojanu.
4. Důkladně promíchejte obsah každé zkumavky pomocí třepačky vortex a poté krátce centrifugujte.

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

**Nastavte PCR reakce**

1. Přidejte 20 μl 3 - Mix ASFV do odpovídajícího počtu jamek na PCR destičce, stripových zkumavek nebo kapilár.
2. Přidejte vzorek nebo kontrolu podle následující tabulky:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Typ vzorku** | **Složka** | **Objem na reakci** |
| Zkušební vzorek | Vzorková DNA | 5,0 μl |
| Pozitivní kontrola | 4a - EPC ASFV | 5,0 μl |
| Extraction control (extrakční kontrola) | Vzorově purifikovaný vzorek | 5,0 μl |
| No-template control (Kontrola bez templátu) (NTC) | Voda bez nukleáz | 5,0 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 cyklus PCR v reálném čase podle pokynů výrobce za použití následujících parametrů.

* Reakční objem: 25 μl
* Pasivní reference: Barvivo ROX (součástí reagencie 3 - Mix ASFV)

**Poznámka**: Barvivo ROX musí být nastaveno, pokud je přístroj schopen toto barvivo detekovat. Přístroje pro PCR v reálném čase, které nejsou schopny detekovat barvivo ROX, lze použít také, a to bez dopadu na přesnost odečtu.

* Vyberte detektory a přiřaďte barviva reportéru a zhášeče sondy TaqMan pro každou jamku, zkumavku nebo kapiláru použitou v analýze.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Cílová struktura** | **Reportér** | **Quencher** |
| ASFV | Barvivo FAM™ | Nefluorescenční zhášeč (NFQ) |
| IPC | Barvivo VIC™ | Barvivo TAMRA™[1] |

[1] Barvivo TAMRA musí být nastaveno pro analýzu PCR v reálném čase, pokud je přístroj schopen toto barvivo detekovat. Přístroje pro PCR v reálném čase, které nejsou schopny detekovat barvivo TAMRA™, lze použít také, a to bez dopadu na přesnost odečtu.

* Program termálního cyklu:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Fáze** | **Opakování** | **Teplota** | **Čas** |
| 1 | 1 | 50 °C | 2 minuty |
| 2 | 1 | 95 °C | 10 minut |
| 3 | 45 | 95 °C | 15 sekund |
|  |  | 60 °C | 1 minuta |

1. Spusťte program termálního cyklovače a sbírejte data z amplifikace v reálném čase během fáze 3.

**Pokyny pro analýzu dat**

* Při analýze surových dat postupujte podle uživatelské příručky přístroje.
* Nastavte prahové hodnoty zvlášť pro každý cíl.
* Interpretujte výsledky pro každou kontrolu a každý vzorek podle získaných hodnot Ct , jak je uvedeno v následujících oddílech.

**Validační kritéria**

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

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Typ reakce** | **Cílová struktura ASFV**  **(Barvivo FAM™)** | **Cíl IPC**  **(Barvivo VIC™)** | **Interpretace** |
| Pozitivní kontrola | Ct = CtQC ASFV ± 3 Ct[1] | Ct < 45 nebo Ct > 45[2] | PCR je validována. |
| Extrakční kontrola[3] | Ct > 45 | Ct = CtQC IPC ± 3 Ct[4] | Extrakce DNA je validována. |
| No-template control (Kontrola bez templátu) | Ct > 45 | Ct > 45 | PCR reagencie jsou validovány. |

[1] Viz tabulka EPC v certifikátu analýzy.

[2] Hodnota IPC pozitivní kontroly se nepoužívá pro validaci testu.

[3] Použijte extrakční kontrolu připravenou stejným postupem extrakce jako vzorky.

[4] Viz tabulka IPC v certifikátu analýzy.

**Interpretace výsledků**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Cílová struktura ASFV**  **(Barvivo FAM™)** | **Cíl IPC**  **(Barvivo VIC™)** | **Interpretace** |
| Ct < 45 | Ct < 45 nebo Ct > 45 | ASFV detekován. |
| Ct > 45 | Ct = Ct extrakční kontroly ± 3 Ct [1] | ASFV nedetekován |
| Ct > 45 | Ct je mimo toto rozmezí: Ct of extrakční kontroly ± 3 Ct[1] | Neplatný výsledek.[2] |

[1] Hodnota Ct extrakční kontroly musí být validována, jak je popsáno v odstavci [„Validační kritéria“ na straně 3](#bookmark59).

[2] Výsledek je neplatný z důvodu nevyhovujícího výsledku IPC.

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

* 1. Nařeďte vzorky DNA 1:10 v 1X TE pufru.
  2. Opakujte postup PCR v reálném čase s použitím 5 μl zředěné DNA a poté výsledky interpretujte následovně.

|  |  |
| --- | --- |
| **Výsledek** | **Interpretace** |
| Zředěná DNA je pozitivní na ASFV. | Výsledek je validován. |
| Zředěná DNA je negativní na ASFV a výsledek IPC je vyhovující. |  |
| Zředěná DNA je negativní na ASFV a výsledek IPC je nevyhovující. | Výsledek je neplatný. |

* 1. Pro zředěné vzorky s neplatnými výsledky opakujte postup izolace DNA na novém alikvotu původního lyzátu vzorku, poté zopakujte test.

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

Při přípravě vzorků pro PCR nebo RT-PCR amplifikaci:

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

* Mezinárodní kontaktní telefonní čísla
* Podpora produktů, a to včetně:
  + Častých dotazů k produktům
  + Software, opravy a aktualizace
  + Školení pro celou řadu aplikací a přístrojů
* Objednávková a webová podpora
* Dokumentace výrobku, a to včetně:
  + Uživatelských příruček, manuálů a protokolů
  + Osvědčení o analýze
  + Bezpečnostní listy (BL; známé také jako MSDS)

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