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

VetMAX Ruminant Abortion Screening Kit

TaqMan PCR v reálném čase pro multiplexní detekci 8 hlavních patogenů, které způsobují zmetání u přežvýkavců(*Coxiella burnetii, Chlamydophila* spp., *Listeria monocytogenes, Salmonella* spp., *Campylobacter fetus, Leptospira* patogenní sérovary, *Anaplasma phagocytophila* a bovinní herpesvirus typu 4)

**Katalogové číslo** SARP

**Pub. No.** MAN0008872 **Rev**. B.0

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Technologie** | **Druhy** | **Nukleová kyselina izolovaná z matric** | **Typ testu** |
| PCR v reálném čase (DNA)   * 2 duplexní a 6 simplexních * Endogenní IPC | Přežvýkavci | Placentární, vaginální a cervikální stěry | 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 stránkách  [**thermofisher.com/support.**](http://thermofisher.com/support) |
|  |  |
|  | **VAROVÁNÍ! POTENCIÁLNÍ BIOLOGICKÉ NEBEZPEČÍ.** Přečtěte si bezpečnostní informace o biologickém nebezpečí na stránce daného výrobku na adrese [thermofisher.com.](http://thermofisher.com/) Používejte vhodné ochranné brýle, oděv a rukavice. |

**Informace o výrobku**

**Popis výrobku**

Souprava **Applied Biosystems VetMAX Ruminant Abortion Screening Kit** je molekulárně diagnostický nástroj pro detekci hlavních agens způsobujících zmetání u přežvýkavců (*Coxiella burnetii*, *Chlamydophila* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter fetus* a *Leptospira* patogenní sérovary, *Anaplasma phagocytophila*, bovinní herpesvirus typu 4) pomocí PCR v reálném čase.

Každý vzorek DNA získaný po extrakci je analyzován v 8 jednotlivých jamkách; každá jamka se používá ke specifické detekci DNA daného patogenu a IPC (interní pozitivní kontroly). Pozitivní IPC odráží účinnost extrakce i nepřítomnost inhibitoru ve vzorcích.

Může být použit na DNA extrahovanou z **placentárních, vaginálních a cervikálních stěrů.**

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

**Obsah soupravy a skladování**

Souprava **VetMAX™ Ruminant Abortion Screening Kit** obsahuje složky, které lze použít k detekci těchto 8 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 SAR Cox b.  (Červená zkumavka) | 2 mixy pro TaqMan® PCR. Každý z nich obsahuje:   * Detekční systém pro cílovou strukturu patogenu, včetně sondy TaqMan nesoucí označení **FAM - NFQ** (nefluorescenční zhášeč) nebo **FAM** - **TAMRA**. * Detekční systém pro IPC, včetně sondy TaqMan nesoucí označení **VIC - TAMRA**. * Pufr a enzym pro PCR v reálném čase. | 500 μl | -30°C až -10°C | -30°C až -10°C |
| 3 - Mix SAR Chlam  (Oranžová zkumavka) | 500 μl | -30°C až -10°C | -30°C až -10°C |
| 3 - Mix SAR ANAP  (Žlutá zkumavka) | 6 mixů pro TaqMan PCR. Každý z nich obsahuje:   * Detekční systém pro cílovou strukturu patogenu, včetně sondy TaqMan nesoucí označení **FAM - NFQ** (nefluorescenční zhášeč). * Pufr a enzym pro PCR v reálném čase. | 500 μl | -30°C až -10°C | -30°C až -10°C |
| 3 - Mix SAR BHV4  (Zelená zkumavka) | 500 μl | -30°C až -10°C | -30°C až -10°C |
| 3 - Mix SAR C. fetus  (Modrá zkumavka) | 500 μl | -30°C až -10°C | -30°C až -10°C |
| 3 - Mix SAR Lepto  (Fialová zkumavka) | 500 μl | -30°C až -10°C | -30°C až -10°C |
| 3 - Mix SAR Listeria  (Bílá zkumavka) | 500 μl | -30°C až -10°C | -30°C až -10°C |
| 3 - Mix SAR Salmo  (Černá zkumavka) | 500 μl | -30°C až -10°C | -30°C až -10°C |
| 4a - EPC SARP  (Hnědá zkumavka) | **Externí pozitivní kontrola:**  Pozitivní kontrola pro 8 patogenů. Sestává z již extrahované nukleové kyseliny, která má být amplifikována během PCR v reálném čase. | 360 μl | -30°C až -10°C | -30°C až -10°C |

**Jen pro veterinární použití. Jen pro použití in vitro.**

**Extrakční a amplifikační kontroly**

**Souprava VetMAX Ruminant Abortion Screening Kit** obsahuje jednu kontrolu, která se používá k validaci amplifikace DNA.

**4a - EPC SARP: 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 validovat amplifikaci cílového patogenu pomocí 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: negativní extrakční kontrola**

Tato kontrola sestává ze složek 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 PCR v reálném čase.

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

**NC: Negativní amplifikační kontrola**

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

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

**Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky**

Není-li uvedeno jinak, jsou všechny materiály k dispozici na stránce  [**thermofisher.com**.](http://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: A515 nm)
* VIC™ (emisní maximum: A554 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 PCR v reálném čase je 25 μl:

* 3 - Mix SAR pathogen: 20 μl na analýzu
* Extrahovaná DNA: 5 μl na analýzu a na mix

**Extrakce DNA**

DNA musí být izolována ze vzorků pro analýzu PCR v reálném čase.

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

**Příprava 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:
   1. Rozmrazte zkumavku s reagencií 3 **- Mix SAR pathogen** při teplotě mezi **2 °C a 8 °C**, na ledu nebo v chlazeném stojanu.
   2. Zkumavku s reagencií **3 - Mix SAR pathogen** promíchejte opatrným protřepáním a poté krátce centrifugujte.
   3. Přidejte po 20 μl reagencie 3**- Mix SAR pathogen** do každé použité jamky PCR destičky, PCR stripu nebo kapiláry.
3. Přidejte vzorek a kontrolní DNA do každého reakčního mixu podle předem definovaného plánu analýzy:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Typ analýzy** | **Složka** | **Objem vzorku** |
| Vzorek pro analýzu | DNA extrahovaná ze vzorku | 5 μl |
| Positive amplification control (Pozitivní amplifikační kontrola) | 4a - EPC SARP | 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 PCR v reálném čase**

1. Na termocykleru vytvořte následujících 9 detektorů:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Reportér** | **Quencher** |
| COXB | FAM | TAMRA(1) |
| CHL, LIST, SALM, CF, ANAP, BHV4, LEPT | FAM | NFQ (nefluorescenční zhášeč) |
| IPC SARP | VIC | TAMRA(1) |
| Pasivní reference: ROX(1) | | |

(1) Fluorofory TAMRA a ROX jsou zapotřebí pro analýzu PCR v reálném čase, pokud je termocykler schopen je detekovat. U ostatních termocyklerů absence schopnosti detekovat tyto fluorofory nezhoršuje analýzu PCR v reálném čase.

1. Ke každému vzorku přiřaďte **odpovídající** detektor patogenu a pokud mix detekuje IPC, také detektor **IPC SAR** v jamce použité pro analýzu.
2. Pro analýzu nastavte následující program PCR v reálném čase:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Opakování kroků | Teplota | Doba trvání |
| Krok 1 | x1 | 50 °C | 2 minuty |
| 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 PCR v reálném čase.

**Analýza výsledků**

**Analýza surových dat**

Pro analýzu surových dat postupujte podle doporučení výrobce termocykleru.

1. Prahové limity nastavte odděleně pro každý cíl 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** | **Detektor IPC SAR (pro detekční mix IPC)** | **Validace** |
| EPC SARP | Ct = Ct QC SAR 4a - EPC SARP ±3Ct(1) | Ct < 45 nebo Ct > 45(2) | Validováno pro PCR |
| 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: U mixů, které nedetekují IPC, viz hodnota IPC Ct získaná pomocí detekčních mixů IPC.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Detektor patogenu** | **Detektor IPC SARP** | **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**

1. Nařeďte vzorek DNA v poměru 1:10 v 1X TE pufru.
2. Proveďte novou PCR analýzu na 5 μl tohoto ředění.
3. Pokud je zředěná DNA pozitivní nebo negativní na cílový patogen s vyhovujícím výsledkem IPC, je získaný výsledek validován.
4. Pokud je zředěná DNA negativní na cílový patogen s nevyhovujícím výsledkem IPC, získaný výsledek 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** f](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. |  |  |