Česká verze

Test RealPCR\* CSFV RNA

Pouze pro veterinární účely.

Název a určené použití

Test RealPCR CSFV RNA je určen k průkazu RNA viru klasického moru prasat (CSFV) extrahovaného z prasečí krve (EDTA), séra, plazmy, orálních tekutin, rektálních výtěrů nebo tkání, včetně slinivky, ledvin, lymfatických uzlin a tonzil. Tkáně je možné testovat prostřednictvím směsných vzorků sestávajících maximálně z 10 individuálních vzorků. Krev (EDTA), plazmu a sérum lze testovat pomocí směsných vzorků sestávajících maximálně z 20 vzorků. Orální tekutiny je možné testovat ve formě směsných vzorků odebraných z kotců s maximálně 30 prasaty. Testování směsného vzorku, který zahrnuje byť jen jediný slabě pozitivní vzorek (např. Ct >32), může vést k negativnímu výsledku kvůli nesprávnému ředění při přípravě směsného vzorku.

Obecné informace

CSFV je původcem klasického moru prasat (CSF), vysoce nakažlivé hemoragické choroby postihující divoká a domácí prasata. CSF se vyznačuje vysokou morbiditou a mortalitou, což způsobuje závažné ekonomické ztráty chovatelům prasat. Tato choroba je na seznamu nebezpečných nákaz Světové organizace pro zdraví zvířat (OIE).

Prasata nakažená CSFV mohou vylučovat velké množství viru ještě předtím, než začnou vykazovat klinické příznaky choroby. Pokud zvířata přežijí akutní nebo subakutní infekci, mohou se stát chronicky nakaženými jedinci, kteří virus přerušovaně nebo kontinuálně vylučují po celý život. U březích prasnic může CSFV přecházet přes placentu a infikovat plody, což vede k abortům a případům mumifikace plodů a mrtvě narozených selat. Pokud jsou prasnice nakaženy uprostřed gestace (zhruba 50–70 dnů březosti), mohou se jim narodit slabá nebo perzistentně viremická selata. Tato perzistentně nakažená selata mohou vylučovat velké množství viru po dobu několika měsíců.

IDEXX RealPCR je modulární systém, v němž jsou cílové směsi specifické pro dané onemocnění spárovány se standardizovanými směsmi vzorové DNA nebo RNA a jednou směsnou pozitivní kontrolou. Reagencie jsou baleny individuálně a prodávány zvlášť, aby s nimi bylo možné manipulovat pokud možno flexibilně.

Směs RealPCR CSFV RNA Mix (směs CSFV RNA Mix) obsahuje primery a sondy pro detekci CSFV RNA při amplifikaci se směsí vzorové RealPCR RNA (RNA MMx). Analýza je založena na principu one-tube RT-PCR. Interní kontrola testu vychází z průkazu endogenní porcinní sekvence RNA přítomné v hostitelském vzorku a označuje se v tomto protokolu jako interní kontrola vzorku (ISC). Průkaz endogenní RNA v porcinních vzorcích zohledňuje aplikaci, extrakci a amplifikaci vzorku. Směs CSFV RNA Mix obsahuje primery a sondu pro průkaz interní kontroly vzorku. K dispozici je také volitelná interní pozitivní kontrola, jmenovitě interní pozitivní kontrola RealPCR (IPC > v1.1), kterou je třeba použít v případě nízké hladiny endogenní hostitelské RNA nebo v situaci, kdy je její přítomnost po extrakci nepravděpodobná (např. vzorky z prostředí). IPC obsahuje syntetickou verzi porcinního cíle ISC RNA a je tudíž kompatibilní se směsí CSFV RNA Mix. Viz pokyny v příbalovém letáku k interní pozitivní kontrole RealPCR (REF 99-56330).

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Označení / obecné informace | Barva uzávěru | Množství | Uchovávání | Cyklyzmrazení/rozmrazení |
| 100 testů | Při převzetí | Po rekonstituci |
| Směs RealPCR CSFV RNA Mix (CSFV RNA Mix), suchá | Žlutá | 1 x 1,0 ml | -25 až 8 °C | -25 až -15 °C | <6 |
|
| REF 99-56022 |  |  |  |  |  |
| Rekonstituujte pomocí čištěné vody určené pro metodu PCR (PCR Grade Water) pro dosažení objemu 1 ml. Směs CSFV RNA Mix uchovávejte v temnu. Datum expirace na lahvičce platí pro suchou i rekonstituovanou formu. Etiketa na zkumavce se směsí CSFV RNA Mix označuje verzi PC, která je kompatibilní s cílovou směsí. Příklad: PC > v1.4 znamená, že cílovou směs je možné použít s PC verzí 1.4 a novějšími verzemi. |
|
|
|
| Vzorová směs RealPCR RNA Master Mix (RNA MMx) | Černá | 1 x 1,0 ml | -25 až -15 °C | N/A | <6 |
| (dlouhodobě) |
| REF 99-56280 |  |  |  |  |  |
| Koncentrovaná vzorová směs, která obsahuje reverzní transkriptázu a hot-start polymerázu pro použití s cílovými směsmi RNA v systému IDEXX RealPCR. RNA MMx je viskóznější než většina vzorových směsí – doporučený způsob manipulace viz část Postup testování. Pro normalizaci objemových nepřesností bylo přidáno referenční barvivo (ROX). Směs RNA MMx chraňte před světlem. |
|
|
|
| Pozitivní kontrola RealPCR, suchá (PC) | Modrá | 1 x 500 µl | -25 až 8 °C | -25 až -15 °C | <6 |
| REF 99-56310 |  |  |  |  |  |
| Rekonstituujte pomocí čištěné vody určené pro metodu PCR (PCR Grade Water) pro dosažení objemu 500 µl. PC obsahuje všechny cíle (targets) IDEXX RealPCR a ISC (včetně cíle pro CSFV) a je určena k použití se všemi cílovými směsmi IDEXX RealPCR. Datum expirace na lahvičce platí pro suchou i rekonstituovanou formu. PC je označena číslem verze (např. v1.3). Jakmile jsou pro produktovou řadu RealPCR vytvořeny nové cílové směsi, cílové sekvence jsou přidány do PC a číslo verze PC se aktualizuje (např. v1.3 se zvýší na v1.4). |
|
|
|
|
| PC zahrnuje Signaturu IDEXX (unikátní sekvence oligonukleotidů). Přítomnost Signatury IDEXX v pracovním prostředí poukazuje na kontaminaci PC. Laboratoře, které chtějí monitorovat kontaminaci PC, mohou detekovat Signaturu IDEXX s použitím směsí RealPCR PC Tracker DNA Mix a RealPCR DNA MMx. |
|
|
| Voda RealPCR PCR Grade | Čirá | 2 x 1,0 ml | -25 až 8 °C | N/A |
| REF 99-56350 |  |  |  |  |  |
| Čištěná voda určená pro PCR metodu (PCR Grade Water) je kvalifikována pro použití při reverzní transkripci-PCR (RT-PCR). Používá se k rekonstituci reagencií RealPCR. Používá se také jako PCR negativní kontrola pro každou testovací várku. Lahvičky s touto vodou nepřesunujte mezi různými pracovními oblastmi PCR. Pro každou oblast je nutné použít samostatnou lahvičku s vodou, aby nedošlo ke kontaminaci. |
|
|

Potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy

* Komerční souprava pro extrakci RNA
* Volitelné – centrifuga s rotorem a adaptéry pro destičky s více jamkami
* Mikrocentrifuga pro odstřeďování mikrozkumavek o objemu 2 ml, která může dosáhnout 1500 – 3000 × g
* Vhodné osobní ochranné pomůcky (např. rukavice, laboratorní plášť)
* Hroty pipet bez nukleázy, odolné proti aerosolům
* Sterilní mikrozkumavky pro přípravu směsi PCR
* Pipety (5 – 1000 µl); speciální pipety pro přípravu směsi PCR
* 96 nebo 384jamkové PCR destičky a optické adhezivní fólie/kryty destiček
* Přístroj pro provádění PCR v reálném čase (Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® ViiA™ 7, Applied Biosystems QuantStudio 5, Agilent Mx3000P™, Agilent Mx3005P™, Agilent AriaMx, Bio-Rad CFX96 Touch™, Bio Molecular Systems Mic qPCR Cycler, QIAGEN Rotor-Gene [pouze 72jamkový rotor], Roche LightCycler® 480 nebo podobný).

Poznámka: přístroj Roche LC480 vyžaduje další kalibraci a nastavení softwaru. Informace o používání tohoto přístroje s reagenciemi RealPCR vám poskytnou pracovníci odborné podpory IDEXX.

Laboratorní postupy a varování

* Nepoužívejte reagencie po datu expirace.
* Celý proces je nutné provádět za nepřítomnosti nukleázy.
* Při práci s reagenciemi a nukleovými kyselinami používejte rukavice bez pudru.
* Pro zabránění zkřížené kontaminace provádějte veškeré příslušné činnosti s použitím hrotů pipet bez nukleázy, které jsou odolné vůči aerosolům, a fyzicky separujte pracoviště, kde dochází k extrakci nukleové kyseliny (a manipulaci s ní), nastavení PCR a provádění PCR.

Rekonstituce suchých složek

Směs CSFV RNA Mix a pozitivní kontrolu rekonstituujte pipetováním vody PCR Grade pro dosažení objemu uvedeného na etiketě příslušné složky. Roztok nechte stát po dobu nejméně 10 minut při teplotě 18 až 26 °C. Před použitím promíchejte a krátce odstřeďte pomocí mikrocentrifugy. Po rekonstituci směsi CSFV RNA Mix a pozitivní kontroly připravte příslušné alikvoty a roztoky uchovávejte ve zmrazeném stavu. Zmražené složky nechte před použitím rozmrazit po dobu přibližně 15 minut při teplotě 18 až 26 °C, jemně je promíchejte a krátce odstřeďte pomocí mikrocentrifugy (~1 500 – 3 000 × g).

Extrakce RNA

Směs CSFV RNA Mix byla validována pomocí níže uvedených komerčních extrakčních metod. Je možné použít také další metody extrakce a lýzy, pokud byly validovány v laboratoři.

RealPCR DNA/RNA Spin Column Kit (IDEXX)
NucleoSpin RNA Kit (Machery Nagel)
QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)

Pokud není test proveden okamžitě po extrakci RNA, uchovávejte čištěnou RNA při teplotě < -15 °C. Jako vzorek by měla být zahrnuta také negativní kontrola pro extrakci ("mock sample").

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Postup testu |  |  |
| 1 | Příprava směsi PCR Mix. |  |
|  | * Rozmrazenou směs RNA MMx promíchejte převrácením nebo jemným vortexováním zkumavky.
* RNA MMx je viskózní roztok, který je nutné pipetovat pomalu.
* Směs PCR Mix připravíte aplikací 10 µl směsi CSFV RNA Mix a 10 µl RNA MMx na každou reakci.
* Při přípravě směsi PCR Mix nejprve pipetujte směs CSFV RNA Mix do zkumavky a poté přidejte směs RNA MMx.Propláchněte hrot pipety s MMx tak, že roztok několikrát nasajete do pipety a opět vypustíte.
* Důkladné promíchání jednotlivých složek zajistíte mírným vortexováním roztoku.
* Směs PCR Mix pomalu pipetujte na PCR destičku.
 |
|  | Směs PCR Mix aplikujte na PCR destičku do 20 minut, anebo ji můžete uchovávat při teplotě 2 až 8 °C po dobu 4 hodin. Směs je možné uchovávat po dobu až 2 týdnů při teplotě -25 až -15 °C. Chraňte před světlem. |
| 2 | Pipetou aplikujte 20 µl směsi PCR Mix do příslušných jamek destičky s více jamkami. |
| 3 | Do každé jamky pipetujte 5 µl vzorku RNA. Konečný objem pro reakci je 25 µl. |
| 4 | Pro každou testovací várku přidejte pozitivní kontrolu (5 µl) a PCR negativní kontrolu (5 µl vody PCR Grade Water). |
| 5 | Destičku uzavřete krytem, a pokud je třeba, jemně ji odstřeďte, aby se obsah jamek usadil a odstranily se vzduchové bublinky. |
| 6 | Pomocí programu IDEXX RealPCR Standard DNA/RNA Cycling Program nastavte termocykler. |
|  | Nastavení reportéru a zhášeče |  |  |
|  | Cíl | Reportér | Zhášeč |  |  |
|  | CSFV | FAM™ | BHQ®(není) |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  | Interní kontrola (ISC/IPC) | HEX™ (VIC) | BHQ (není) |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  | Pasivní reference | ROX™ | nerelevantní |  |  |
|  | Program RealPCR\* Standard DNA/RNA Cycling Program |
|  |  | Teplota | Čas | Cykly |  |
|  | Reverzní transkripce (RT) | 50 °C | 15 min | 1 |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  | Denaturace | 95 °C | 1 min | 1 |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  | Amplifikace\*\* | 95 °C 60 °C | 15 s30 s | 45 |  |
|  | \*\*Nastavte přístroj tak, aby zaznamenával fluorescenci až po amplifikaci při 60 °C. |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 7 | Analýza dat |  |  |  |
|  | Při nastavování softwaru přístroje zadejte každému cíli a interní kontrole unikátní identifikátor. Příklad: Pokud jsou cíle A a B na téže destičce, jamky A musí být analyzovány nezávisle na jamkách B. Způsob analýzy dat je uveden v konkrétním návodu k použití daného přístroje. Pro nastavení prahu použijte funkci Auto Ct.* Agilent Mx3000P a Mx3005P – pro analýzu je nutné používat metodu fluorescence s prahovou hodnotou založenou na pozadí (background-based threshold fluorescence method).
* Přístroj QIAGEN Rotor-Gene – ručně nastavte prahovou přímku nad pozadí v lineární fázi exponenciální amplifikace. To lze nejsnáze provést v "log" zobrazení grafů. Tento krok je třeba opakovat pro každý reportér v cílové směsi.
* Přístroje Applied Biosystems – automatické nastavení prahů v některých situacích nepřináší uspokojivé výsledky. V takových případech je nutné Ct hodnoty určit ručním nastavením prahu. To lze nejsnáze provést v "log" zobrazení grafů. Tento krok je třeba opakovat pro každý reportér v cílové směsi.
 |
|  | Kritéria validity |  |  |  |
|  |  | Hodnota FAM Ct | Hodnota HEX (VIC) Ct |  |
|  | Pozitivní kontrola | <38 | <38 |  |
|  |  |  |  |  |
|  | PCR negativní kontrola | Není signál | Není signál |  |
|  |  |  |  |  |
| 8 | Interpretace výsledků |  |  |  |
|  | Výsledek testu vzorku | Signál FAM | Signál HEX (VIC) | Další charakteristiky |
|  | CSFV RNAdetekováno | Ano | Ano/Ne | Pozitivní Ct hodnota a charakteristická křivka amplifikace v porovnání s PCR negativní kontrolou.Očekává se amplifikační křivka interní kontroly v kanále HEX (VIC); u některých silně CSFV-pozitivních vzorků RNA může dojít k negativnímu výsledku interní kontroly.† |
|  |
|  |  |  |  |
|  | CSFV RNAnedetekováno | Ne | Ano | Amplifikační křivka v kanále interní kontroly HEX (VIC). |
|  |  |  |  |
|  | Neplatné‡ | Ne | Ne | Absence amplifikační křivky v kanálech FAM a HEX (VIC) poukazuje na neplatný výsledek. |
|  | † Cílová směs je optimalizována pro detekci MAP RNA; silně pozitivní vzorek RNA může vést k potlačení detekce interní kontroly. |
|  | ‡ Neplatný vzorek může poukazovat na nesprávnou aplikaci, extrakci a/nebo PCR vzorku. RNA by měla být zředěna pětinásobně čištěnou vodou (PCR Grade Water) a opětovně testována; jako vzor je třeba zahrnout neředěnou RNA. Pokud je test stále neplatný, doporučujeme provést novou extrakci. |

Odbornou pomoc získáte zde:

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 nebo +1 207 556 4895 IDEXX Europe Tel: +800 727 43399

Obraťte se na oblastního manažera nebo distributora IDEXX nebo navštivte naši webovou stránku: [idexx.com/contactlpd](http://idexx.com/contactlpd)

\*IDEXX, RealPCR a Test With Confidence jsou ochranné známky nebo registrované ochranné známky společnosti IDEXX Laboratories, Inc. nebo jejích přidružených společností v USA a/nebo dalších zemích. Všechny další produkty a názvy a loga společností jsou ochrannými známkami svých držitelů.

Barviva, která jsou součástí tohoto produktu, jsou prodávána na základě licence společnosti Biosearch Technologies, Inc. a jsou chráněna patenty USA a mezinárodními patenty, ať už byly vydány nebo je o ně zažádáno. Licence pokrývá veterinární aplikace. Není určeno pro IVD použití u člověka.

Informace o patentu: [idexx.com/patents](http://idexx.com/patents)

© 2019 IDEXX Laboratories, Inc. Všechna práva vyhrazena.