**Test RealPCR\* MAP DNA**

Pouze pro veterinární účely.

Název a způsob použití

Test RealPCR MAP DNA se používá k detekci DNA bakterie *Mycobacterium paratuberculosis* extrahované ze vzorků trusu přežvýkavců (týká se skotu a koz) a vzorků získaných z prostředí pomocí odběrových návleků na obuv (u skotu). Trus skotu je možné testovat formou směsných vzorků sestávajících z 5 individuálních vzorků.

Obecné informace

Paratuberkulóza (Johneho choroba) vyvolaná infekcí *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) je chronická enteritida přežvýkavců, mezi jejíž nejčastější klinické příznaky patří silný průjem a úbytek hmotnosti. Zvířata se často nakazí v prvním roce života po požití krmiva kontaminovaného trusem jiných nakažených zvířat. Vzhledem k několikaměsíční až několikaleté inkubační době se choroba začne klinicky projevovat až v mladém dospělém věku zvířete. Chorobu není možné vyléčit a nakažené zvíře nakonec uhyne.

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 MAP DNA Mix (směs MAP DNA Mix) obsahuje primery a sondy pro detekci MAP DNA při amplifikaci se směsí vzorové RealPCR DNA (DNA MMx). Interní kontrolou testu je interní pozitivní kontrola RealPCR (IPC ≥ v1.1). IPC obsahuje syntetickou DNA, která je amplifikována primery a sondami zahrnutými ve směsi MAP DNA Mix.

Materiál a uchovávání

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Označení / obecné informace | Barva uzávěru | Množství | Uchovávání | | Cykly zmrazení / rozmrazení |
| 100 testů | Při převzetí | Po rekonstituci |
| **Směs RealPCR MAP DNA Mix (směs MAP DNA), suchá** | Zelená | 1 x 1,0 ml | -25 až 8 °C | -25 až -15 °C | ≤ 6 |
| ref. 99-56620  Rekonstituujte pomocí čištěné vody určené pro metodu PCR (PCR Grade Water) pro dosažení objemu 1 ml. Směs MAP DNA Mix uchovávejte v temnu. Datum exspirace na lahvičce platí pro suchou i rekonstituovanou formu. Etiketa na zkumavce se směsí MAP DNA 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 DNA Master Mix (DNA MMx)** | Fialová | 1 x 1,0 ml | -25 až -15 °C  (dlouhodobě) | N/A | ≤ 6 |
| ref. 99-56250  Koncentrovaná vzorová směs, která obsahuje hot-start polymerázu pro použití s cílovými směsmi DNA v systému IDEXX RealPCR. DNA MMx je viskóznější než většina vzorových směsí – doporučený způsob manipulace viz část Postup testování. Pro normalizaci objemových nepřesností bylo přidáno referenční barvivo (ROX). DNA MMx chraňte před světlem. | | | | | |
| **RealPCR**  **– pozitivní kontrola, 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 interní kontroly (včetně cíle pro MAP) a je určena k použití se všemi cílovými směsmi IDEXX RealPCR. Datum exspirace 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. | | | | | |
| **RealPCR**  **Interní pozitivní kontrola (IPC)** | Bílá | 1 x 500 µl | -25 až 8 °C | -25 až -15 °C | ≤ 6 |
| ref. 99-56330  Rekonstituujte pomocí čištěné vody určené pro metodu PCR (PCR Grade Water) pro dosažení objemu 500 µl. IPC obsahuje všechny cílové interní kontroly IDEXX RealPCR. Datum exspirace na lahvičce platí pro suchou i rekonstituovanou formu. IPC je označena číslem verze (např. v1.3).  Jakmile jsou pro produktovou řadu RalPCR vytvořeny nové cílové interní kontroly, cílové sekvence jsou přidány do IPC a číslo verze IPC se aktualizuje (např. v1.3 se zvýší na v1.4). | | | | | |
| **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. | | | | | |

**Poznámka:** V tabulce na konci tohoto dokumentu je uveden popis symbolů používaných v příbalové informaci a na etiketě.

Nezbytné pomůcky a nástroje, které nejsou součástí sady

* Komerční souprava pro extrakci DNA
* Volitelné – souprava RealPCR Pre-Extraction Kit (IDEXX 99-56104)
* 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, Agilent Mx3000P™, Agilent Mx3005P™, Agilent AriaMx, Bio-Rad CFX96 Touch™, Applied Biosystems QuantStudio™ Flex, 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 exspirace.
* 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 MAP DNA Mix, interní pozitivní kontrolu a pozitivní kontrolu rekonstituujte pipetováním čištěné 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 MAP DNA Mix, IPC 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   
(~1500 – 3000 × g).

Použití RealPCR IPC a negativní kontroly pro extrakci

Na každou extrakci použijte 2 µl rekonstituované IPC. IPC přidejte do extrakčního lytického roztoku a postupujte podle pokynů ke komerční extrakční soupravě. Jako vzorek by měla být zahrnuta také negativní kontrola pro extrakci ("mock sample").

Příprava vzorku a extrakce DNA

Test RealPCR MAP DNA byl validován s různými extrakčními metodami pro zajištění různých úrovní citlivosti testu vzorků trusu skotu. Díky tomu mohou být programy tlumení MAP rozděleny do fází, pro něž jsou optimální různé úrovně citlivosti. V rané fázi programu tlumení MAP je cílem určit a izolovat zvířata, která v trusu vylučují velké množství MAP a potenciálně kontaminují zvířata, která MAP nevylučují. Pro tyto okolnosti jsou vhodné níže uvedené extrakční metody se standardní citlivostí. V dalších fázích musí extrakční metoda zajistit vyšší citlivost s cílem identifikovat zvířata vylučující i malé množství MAP. V tomto stádiu testování se doporučuje používat extrakční metody se zvýšenou citlivostí. Pro tyto metody byly také validovány vzorky od malých přežvýkavců a vzorky z prostředí získané pomocí odběrových návleků na obuv. Odpovídající zlepšení citlivosti nebylo zjištěno.

Metody se standardní citlivostí

Před extrakcí nukleové kyseliny jsou vzorky homogenizovány podle protokolu k soupravě RealPCR Pre-Extraction Kit (99-56104). Tento krok nahrazuje přípravu vzorku trusu popsanou níže v části týkající se komerčních extrakčních metod. Použijte 200 µl homogenátu trusu RealPCR Pre-Extraction a pokračujte v extrakci nukleové kyseliny podle příslušného návodu k použití dané komerční extrakční soupravy.

Při přípravě směsných bovinních vzorků použijte první supernatant (Krok 5) nebo finální homogenát (Krok 8) podle protokolu pro RealPCR Pre-Extraction. Pokud není test proveden okamžitě po extrakci DNA, uchovávejte čištěnou DNA při teplotě < -15 °C.

Soupravy pro extrakci nukleové kyseliny validované pro použití s RealPCR Pre-Extraction. Je možné použít také další extrakční metody, pokud byly validovány v laboratoři.

RealPCR\* DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX)  
RealPCR\* DNA/RNA Spin Column Kit (IDEXX)   
NucleoMag® VET (Macherey Nagel)   
NucleoSpin® Virus (Macherey Nagel)

Metody se zvýšenou citlivostí

Níže uvedené komerční extrakční metody zajišťují vyšší citlivost testování vzorků trusu skotu a není nutné při nich používat přídavné pre-extrakční reagencie. Pokud není test proveden okamžitě po extrakci DNA, uchovávejte čištěnou DNA při teplotě < -15 °C. Je možné použít také další extrakční metody, pokud byly validovány v laboratoři.

NukEx Extreme (gerbion GmbH & Co.KG):

Připravte vzorky podle popisu v části 10.1.1 (Izolace RNA a DNA ze vzorků trusu skotu, ovcí a koz) a 10.2 (Podrobný protokol pro extrakci metodou "spin column").

NukEx Mag Extreme (gerbion GmbH & Co.KG):

Připravte vzorky podle popisu v části 10.2.1 (Izolace RNA a DNA ze vzorků trusu skotu, ovcí a koz) a 10.3 (Podrobný protokol pro manuální použití) nebo 10.2 (Podrobný protokol pro KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processor).

Doporučené komerční metody extrakce

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Lýza vzorku** | **Extrakce DNA** | **Trus skotu** | **Trus malých přežvýkavců** | **Vzorek z prostředí získaný pomocí návleků** |
| **RealPCR**  **Volitelné – souprava RealPCR Pre-Extraction (IDEXX** | Souprava pro extrakci pomocí magnetických kuliček RealPCR Magnetic Bead Extraction Kit, IDEXX | Standardní citlivost | | |
| Souprava RealPCR Spin Column Kit, IDEXX |
| Souprava NucleoMag VET Magnetic Extraction Kit, Macherey-Nagel |
| NucleoSpin Virus, Macherey-Nagel |
| NukEx Pure RNA/DNA, Gerbion |
| NukEx Extreme SC, Gerbion | | Zvýšená citlivost | Standardní citlivost | |
| NukEx Mag Extreme SC, Gerbion | |

Produktové kódy a verze příbalové informace komerčních extrakčních souprav jsou podrobně uvedeny v Technické příručce RealPCR – část "Metody extrakce vzorků pro RealPCR" Pro nezbytné materiály, které nejsou součástí dodávky, viz Návody k použití jejich výrobců.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Postup testování** | | | | |
| **1** | Příprava směsi PCR Mix.   * Rozmrazenou směs DNA MMx promíchejte převrácením nebo jemným vortexováním zkumavky. * DNA MMx je viskózní roztok, který je nutné pipetovat pomalu. * Směs PCR Mix připravíte aplikací 10 µl směsi MAP DNA Mix a 10 µl DNA MMx na každou reakci. * Při přípravě směsi PCR Mix nejprve pipetujte směs MAP DNA Mix do zkumavky a poté přidejte směs DNA MMx. Propláchněte hrot pipety s MMx tak, že roztok několikrát roztok nasajete do pipety a opět vypustíte. * Důkladné promíchání jednotlivých složek zajistíte mírným vortexováním roztoku. * Směs PCR Mix pomalu pipetou přeneste na PCR destičku. | | | |
| Směs PCR Mix je možné uchovávat po dobu 24 hodin při teplotě 2 až 8 °C nebo po dobu 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 přeneste 5 µl vzorku DNA. 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 |  |
|  | MAP | FAM | BHQ  (není) |  |
|  |  |  |  |  |
|  | Interní kontrola (IPC) | HEX(VIC) | BHQ  (není) |  |
|  |  |  |  |  |
|  | Pasivní reference | ROX | N/A |  |
|  | Program RealPCR\* Standard DNA/RNA Cycling Program | |  |  |
|  |  | Teplota | Čas | Cykly |
|  | Reverzní transkripce (RT) | 50 °C | 15 min | 1 |
|  |  |  |  |  |
|  | Denaturace | 95 °C | 1 min | 1 |
|  |  | 95 °C | 15 s |  |
|  | Amplifikace\*\* |  |  | 45 |
|  |  | 60 °C | 30 s |  |
|  | \*\*Nastavte přístroj tak, aby zaznamenával fluorescenci až po amplifikaci při 60 °C.  **Poznámka:** pro cíle DNA je možné spustit cyklovací protokol bez kroku RNA "RT". Doporučujeme nicméně krok "RT" používat rutinně, aby bylo možné testy RNA snadněji zařadit do pracovního postupu. | | | |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **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 vzorku | Signál FAM | Signál HEX (VIC) | Další charakteristiky |
|  | MAP DNA  detekováno | Ano | Ano/Ne | Pozitivní Ct hodnota a charakteristická křivka amplifikace v porovnání s PCR negativní kontrolou. Výsledky s hodnotou Ct > 40 mohou budit podezření.  Očekává se amplifikační křivka interní kontroly v kanále HEX (VIC); u některých silně MAP-pozitivních vzorků DNA může dojít k negativnímu výsledku interní kontroly.† |
|  |  |  |  |  |
|  | MAP DNA  nedetekováno | Ne | Ano | Amplifikační křivka v kanále interní kontroly HEX (VIC) a hodnota Ct < 36. |
|  |  |  |  |  |
|  | Neplatné‡ | Ne | Ne | Absence amplifikační křivky v kanálech FAM a HEX (VIC) poukazuje na neplatný výsledek. |
|  | †Cílová směs je optimalizována pro detekci MAP DNA; silně pozitivní vzorek DNA může vést k potlačení detekce interní kontroly.  ‡Neplatný vzorek může poukazovat na nesprávnou aplikaci, extrakci a/nebo PCR vzorku. DNA by měla být zředěna pětinásobně čištěnou vodou (PCR Grade Water) a opětovně testována; jako vzor je třeba zahrnout neředěnou DNA. 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

IDEXX, RealPCR a Test With Confidence jsou známky nebo registrované známky společnosti IDEXX Laboratories, Inc. nebo jejích přidružených společností v USA a/nebo dalších zemích Všechny další produkty a názvy a loga společností jsou 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 patentech: idexx.com/patents

© 2018 IDEXX Laboratories, Inc. Všechna práva vyhrazena.