**Appliedbiosystems NÁVOD K POUŽITÍ**

**Souprava** **VetMAX PRRSV EU & NA 3.0**

Detekce viru zodpovědného za reprodukční a respirační syndrom prasat pomocí RT-PCR v reálném čase

**Katalogové číslo** A57016

**Doc. Part No.** 100119740 **Publikace č.** MAN0028563 **Rev**. B.0

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Technologie** | **Druhy** | **Matrice vzorku** | **Typ testu** |
| Real-time RT-PCR (RNA)* Triplexová analýza
* Exogenní IPC
 | Prase | * Sérum
* Plná krev
* Sperma
* Tkáň
* Orální tekutina
* Supernatant z buněčné kultury
 | Individuální nebo sdružený [1] |

[1] Sloučený materiál zahrnující až pět vzorků séra, plné krve nebo spermatu.

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

**Popis výrobku**

Souprava Applied Biosystems VetMAX PRRSV EU & NA 3.0 (Kat. č. A57016) umožňuje detekci viru zodpovědného za reprodukční a respirační syndrom prasat (PRRSV). Souprava má aktualizované provedení a je schopna detekovat cirkulující kmeny PRRSV. Souprava obsahuje testy a reagencie pro detekci cílových struktur PRRSV EU, PRRSV NA a interních pozitivních kontrol (IPC) pomocí jednojamkové RT-PCR v reálném čase za použití chemických reagencií pro hydrolýzu fluorescenční sondy.

Souprava je validována pro použití na RNA extrahované ze séra, plné krve, spermatu, tkání, orální tekutiny a z procesní tekutiny. Validační zpráva je k dispozici na vyžádání u vašeho obchodního zástupce nebo technického specialisty.

PRRSV způsobuje významné ztráty v chovech prasat v důsledku reprodukčních poruch, respiračních stavů a zpomalení růstu. PRRSV RNA může být detekována v krvi a spermatu 24-48 hodin po infekci. RT-PCR v reálném čase je nejcitlivější metodou pro detekci PRRSV a je výborným nástrojem pro management zdraví stáda

Souprava obsahuje následující testy a reagencie.

* **1 – Sekvence PRRSV 3.0:** Obsahuje primery a sondy pro optimalizovanou detekci cílových struktur PRRSV EU, PRRSV NA a IPC pomocí triplexové RT-PCR v reálném čase.
* **2 – Master Mix PRRSV 3.0:** Obsahuje enzymy a pufry, které jsou nezbytné pro triplexní reakci RT-PCR v reálném čase.
* **4a – EPC PRRSV EU/NA 3.0:** RNA templát s cílovými sekvencemi PRRSV EU, PRRSV NA a Xeno (IPC). Slouží jako externí pozitivní kontrola pro složky RT-PCR v reálném čase a používá se k nastavení validačních kritérií pro výsledky testů.
* **5 – IPC PRRSV 3.0:** Přidává se ke každému vzorku a ke každé extrakční kontrole během extrakce RNA. Slouží jako extrakční kontrola pro postup izolace RNA a používá se k monitorování přítomnosti inhibitorů PCR.

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

**Obsah a skladování**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Složka** | **Množství[1]** | **Skladování** |
| 1 – Sekvence PRRSV 3.0 | 220 μl | -30 °C až -10 °C |
| 2 – Master Mix PRRSV 3.0 | 1100 μl |
| 4a – EPC PRRS EU/NA 2.0 | 2 x 80 μl |
| 5 – IPC PRRSV 3.0 | 215 μl |  |

[1] Objemy jsou dostačující pro 100 reakcí RT-PCR v reálném čase (12 μl).

**Potřebné materiály nejsou součástí dodávky**

Pokud není uvedeno jinak, jsou všechny materiály k dispozici na stránce **thermofisher.com**. „MLS“ znamená, že materiál je dostupný prostřednictvím **fisherscientific.com** nebo od jiného významného laboratorního dodavatele.

|  |  |
| --- | --- |
| **Položka** | **Zdroj** |
| **Přístroj pro PCR v reálném čase, jeden z následujících:** |
| Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System* Precizní držák destiček pro mikrotitrační destičky (A24820)
* Precizní držák destiček pro 0,2 ml zkumavky a stripy (4367033)
 | Kontaktujte místní obchodní kancelář. |
| Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System* Precizní držák destiček pro destičky (4359652)
* 7500 Precizní držák destiček pro 0,1 ml zkumavkové stripy (A29252)
 |
| Applied Biosystems QuantStudio 5 Real-Time PCR System |
| **Zařízení** |
| Nastavitelné pipetory | MLS |
| Mikrocentrifuga | MLS |
| Centrifuga s destičkovým adaptérem | MLS |
| Laboratorní míchačka (třepačka vortex nebo ekvivalentní) | MLS |
| Dvě nádoby na led nebo chlazené stojany:* Jedna pro oblast nastavení PCR, kde je připraven hlavní mix pro PCR
* Jedna pro oblast, kde jsou připraveny vzorky RNA a kontroly
 | MLS |
| **Zkumavky, destičky a další spotřební materiál** |
| Optické reakční desky a adhezivní kryty | thermofisher.com/plastics |
| Pipetovací špičky | thermofisher.com/[pipettetips](http://www.thermofisher.com/pipettetips) |
| Jednorázové rukavice | MLS |
| **Reagencie** |
| Voda bez nukleáz (nikoli ošetřena DEPC) | AM9939 |
| 1X TE pufr | MLS |

**Pokyny k postupům**

* Použijte následující kontrolní reakce pro každý cyklus RT-PCR v reálném čase.
	+ Positive control (Pozitivní kontrola) - použijte 4a – EPC PRRS EU / NA 3.0.
	+ Extraction control (Extrakční kontrola) - použijte kontrolní vzorky, které byly připraveny stejným postupem izolace RNA jako testované vzorky.
	+ No-template control (Kontrola bez templátu) (NTC) - použijte vodu bez nukleáz.
* Dodržujte správnou laboratorní praxi, aby se zabránilo falešné pozitivním výsledkům a kontaminaci testovaných vzorků PCR produkty (viz „Správná laboratorní praxe pro PCR a RT-PCR“ strana 3).

**Pokyny pro vstupní RNA**

|  |  |
| --- | --- |
| **Krok, proces nebo parametr** | **Doporučení** |
| Metoda extrakce RNA | Applied Biosystems MagMAXCORE Nucleic Acid Purification Kit (kat č. A32700) |
| Změna metody izolace RNA pro testované vzorky a modelové vzorky | Během extrakce RNA přidejte ke každému vzorku a extrakční kontrole 2 µl z 5 - IPC PRRSV 3.0. |
| Příprava modelových vzorků (pro použití v extrakčních kontrolách pro PCR) | Připravte minimálně jeden kontrolní vzorek, jako výchozí materiál použijte vodu bez nukleázy (neušetřenou DEPC).Zpracujte modelový vzorek souběžně ve stejném postupu izolace RNA, který se používá pro testované vzorky.  |

**Příprava**

1. Rozmrazte reagencie a vzorky.
	1. Rozmrazte 1 - Sekvence PRRSV 3.0 a 2 - Master Mix PRRSV 3.0 v nádobě s ledem nebo v chladicím boxu.
	2. Rozmrazte 4a – vzorky EPC PRRSV EU/NA 3.0, 5 - IPC PRRSV 3.0 a RNA v samostatné nádobě s ledem nebo v chladicím boxu.
2. Každou destičku nebo zkumavku uzavřete, promíchejte a krátce centrifugujte pro shromáždění obsahu.

Rozmražené reagencie a vzorky uchovávejte při teplotě 2 až 8 °C až do použití.

**Připravte reakční směs RT-PCR**

1. Reakční směs RT-PCR připravte v nádobě s ledem nebo v chladicím boxu podle následující tabulky.

|  |  |
| --- | --- |
| **Složka** | **Objem na reakci** [1] |
| **Pro 1 vzorek** | **Pro N vzorků** |
| 1 - Sekvence PRRSV 3.0 | 2 μl | N x 2 μl |
| 2 - Master Mix PRRSV 3.0 | 10 μl | N x 10 μl |
| **Celková reakční směs RT-PCR** | 12 μl | N x 12 μl |

[1] Připravte si dostatečný objem pro dodatečnou reakci vzhledem k celkovému počtu reakcí, které mají být provedeny během analýzy (vzorky a kontroly). Nikdy nemíchejte složky z různých šarží souprav (viz certifikát analýzy).

2. Reakční směs RT-PCR důkladně promíchejte na třepačce a poté krátce centrifugujte pro shromáždění obsahu.

**Pokyny pro analýzu dat**

* Při analýze surových dat postupujte podle uživatelské příručky přístroje.
* Nastavte prahové hodnoty zvlášť pro každý cíl.
* Pro validací cyklu a interpretací výsledků si přečtěte certifikát analýzy pro výrobní šarži soupravy.

**DŮLEŽITÉ!** Reakční směs RT-PCR je nutné důkladně promíchat

**Nastavte reakce RT-PCR**

1. Do požadovaného počtu jamek na destičce nebo do zkumavek nadávkujte 12 µl reakční směsi RT-PCR.
2. Přidejte indikovanou složku pro každý typ reakce.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Typ reakce** | **Složka** | **Objem na reakci** |
| Zkušební vzorek | Vzorková RNA | 8,0 μl |
| Pozitivní kontrola | 4a – EPC PRRS EU/NA 3.0 | 8,0 μl |
| Extrakční kontrola | Modelový vzorek | 8,0 μl |
| Kontrola bez templátu (NTC) | Voda bez nukleáz | 8,0 μl |

1. Každou destičku nebo zkumavku uzavřete, promíchejte a krátce odstřeďte pro shromáždění obsahu

**Nastavte a spusťte přístroj pro PCR v reálném čase**

1. Nastavte cyklus RT-PCR v reálném čase podle pokynů výrobce za použití následujících parametrů.
* Reakční objem: 20 μl
* Pasivní reference: barvivo ROX (součástí reagencie 2 - Master Mix PRRSV 3.0)

**Poznámka:** Barvivo ROX musí být vybráno, pokud je přístroj schopen toto barvivo detekovat. Přístroj pro PCR v reálném čase, který není schopen detekovat barvivo ROX, lze použít také, a to bez dopadu na přesnost čtení.

* Program přístroj pro PCR v reálném čase:
	+ Standardní režim (7500 Real-Time PCR System, QuantStudio 5 Real-Time PCR System)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Fáze** | **Opakování** | **Teplota** | **Čas** |
| 1 | 1 | 50 °C | 5 minut |
| 2 | 1 | 95 °C | 10 minut |
| 3 | 40 | 95 °C | 15 sekund |
|  |  | 60 °C | 1 minuta  |

* + Rychlý režim (7500 Fast Real-Time PCR System, QuantStudio 5 Real-Time PCR System)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Fáze** | **Opakování** | **Teplota** | **Čas** |
| 1 | 1 | 50 °C | 5 minut |
| 2 | 1 | 95 °C | 10 minut |
| 3 | 40 | 95 °C | 3 sekundy |
|  |  | 60 °C | 30 sekund |

1. Vyberte nebo vytvořte detektory barviv, poté přiřaďte ke každé jamce nebo zkumavce.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Cílová struktura** | **Reportér** | **Quencher** |
| PRRSV EU | Barvivo VIC | Nefluorescenční zhášeč |
| PRRSV NA | Barvivo FAM |
| IPC[1] | Cy5 barvivo |

[1] IPC: 5 - IPC PRRSV 3.0.

1. Spusťte příslušný program PCR přístroje a odeberte data amplifikace v reálném čase během inkubace při 60 °C

**Validační kritéria**

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

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Typ reakce** | **Cílová struktura PRRSV EU****(Barvivo VIC)** | **Cílová struktura PRRSV NA****(Barvivo FAM)** | **Cílová struktura IPC****(barvivo Cy5)** | **Interpretace** |
| Amplifikace – pozitivní kontrola | Ct = CtQC EU of 4a – EPCPRRSV EU/NA 3.0 ± 3 Ct[1] | Ct = CtQC NA 4a - EPCPRRSV EU/NA 3.0 ± 3 Ct[1] | Ct < 40  [2] | PCR je validována. |
| Extrakční kontrola | Ct > 40 | Ct > 40 | Ct = CtQC 5 - IPC PRRSV ± 3 Ct[3] | Extrakce RNA je validována. |
| No-template control (Kontrola bez templátu) | Ct > 40 | Ct > 40 | Ct > 40 | PCR reagencie jsou validovány. |

[1] Viz tabulka EPC v certifikátu analýzy.

[2] Očekává se pozitivní signál. Hodnota IPC Ct se nepoužívá pro interpretaci výsledků vzorků.

[3] Viz tabulka IPC v certifikátu analýzy.

**Interpretace výsledků**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Cílová struktura PRRSV EU****(Barvivo VIC)** | **Cílová struktura PRRSV NA****(Barvivo FAM)** | **Cílová struktura IPC****(barvivo Cy5)** | **Interpretace** |
| Ct < 40 | Ct > 40 | Libovolná hodnota | Je detekován PRRSV EU. |
| Ct > 40 | Ct < 40 | Libovolná hodnota | Je detekován PRRSV NA. |
| Ct < 40 | Ct < 40 | Libovolná hodnota | Jsou detekovány PRRSV EU a NA. |
| Ct > 40 | Ct > 40 | Ct s Ct extrakční kontroly + 3 Ct[1] | PRRSV EU a NA nejsou detekovány. |
| Ct > 40 | Ct > 40 | Ct > Ct extrakční kontroly + 3 Ct [1] | Neplatný výsledek. |

[1] Ct extrakční kontroly musí být validována, jak je popsáno v odstavci [„Validační kritéria“ na straně 3](#bookmark10)

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

1. Nařeďte vzorky RNA 1:10 v 1X TE pufru.
2. Opakujte postup RT-PCR v reálném čase s použitím 8 μl zředěné RNA a poté výsledky interpretujte následovně.

|  |  |
| --- | --- |
| **Výsledek** | **Interpretace** |
| Zředěná RNA je pozitivní alespoň na jednu cílovou strukturu PRRSV (NA nebo EU). | Výsledek je validován. |
| Zředěná RNA je negativní pro obě cílové struktury PRRSV (NA a EU) a výsledek IPC je shodný. |
| Zředěná RNA je negativní pro obě cílové struktury PRRSV (NA a EU) a výsledek IPC je nevyhovující | Výsledek je neplatný. |

1. Pro zředěné vzorky s neplatnými výsledky opakujte postup izolace RNA na novém alikvotu původního lyzátu vzorku.

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

* 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** pro informace o nejnovějších službách a podpoře:

* Mezinárodní kontaktní telefonní čísla
* Informace o podpoře produktu
	+ Časté dotazy a odpovědi k výrobkům
	+ Software, opravy a aktualizace
	+ Školení pro celou řadu aplikací a přístrojů
* Objednávková a webová podpora
* Dokumentace výrobku
	+ 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.

**Omezená záruka na výrobek**

Společnost Life Technologies Corporation a/nebo její sesterské společnosti poskytují záruku na své výrobky, jak je uvedeno ve Všeobecných podmínkách prodeje Life Technologies na webových stránkách společnosti Life Technologies na adrese **www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.htmi.** Pokud máte jakékoliv dotazy, obraťte se prosím na společnost Life

Technologies na adrese **www.thermofisher.com/support.**

