

Blue Avian IAV Fast qRT-PCR Kit

(zestaw diagnostyczny wykrywający fragmenty genomu wirusa grypy typu A u ptaków)

Blue Avian IAV Fast qRT-PCR Kit jest przeznaczony do wykrywania sekwencji RNA specyficznych dla wirusa grypy typu A w próbkach ptasich. Oczyszczony materiał genetyczny wirusa jest amplifikowany za pomocą real-time RT-PCR i wykrywany przy pomocy sond specyficznych dla wirusa grypy typu A, znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym FAM. Identyfikacja wirusa następuje na podstawie silnie konserwowanego regionu w segmencie 7. wirusa kodującym białko M1, M2 oraz regionu w segmencie 3. kodującym białko PA będące częścią kompleksu polimerazy RNA. Dodatkowo zestaw zawiera startery i sondę znakowaną barwnikiem HEX umożliwiające wykrywanie fragmentu ptasiego genu ACTB, kodującego beta-aktynę a stanowiącego endogenną kontrolę wewnętrzną poprawności izolacji RNA i reakcji PCR.

Zawartość zestawu

Składnik	Nr kat. E0444-01 100 reakcji po 25 µl	Nr kat. E0444-02 500 reakcji po 25 µl
IAV Master Mix* brązowa probówka	4 x 500 µl	20 x 500 µl
Positive Control** czarna nakrętka	200 µl	1000 µl
RNase free Water przezroczysta nakrętka	1200 µl	5 x 1200 µl

Przechowywanie

Wszystkie składniki zestawu należy przechowywać w temperaturze -20°C.

* Unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania (>2), ponieważ może to zmniejszyć czułość testu. Odczynnik należy zamrozić w mniejszych porcjach, jeśli jest używany tylko sporadycznie.

** Kontrolę pozytywną należy przechowywać oddzielnie, z dala od pozostałych składników zestawu.

Rodzaje próbek RNA, przygotowanie próbki RNA

RNA z wymazów (z jamy dziobowo-gardłowej, tchawicy, kloaki), próbek tkanek, narządów (homogenatów narządów, jelit), próbek kału, kart do przechowywania kwasów nukleinowych (kart FTA) należy wyizolować przy pomocy zestawów dedykowanych do oczyszczania RNA wirusowego. Należy postępować zgodnie z instrukcją zalecaną przez producenta zestawu. Wysoka czułość zestawu pozwala na detekcję wirusa grypy typu A zarówno w pojedynczych próbkach, jak i w próbkach zmieszanych (pulowanych) w ilości maksymalnie 10 próbek indywidualnych.

Barwnik referencyjny ROX

Barwnik referencyjny ROX zawarty w IAV Master Mix zestawu Blue Avian IAV Fast qRT-PCR Kit umożliwia normalizację fluorescencji w niektórych urządzeniach real-time PCR. Użycie barwnika referencyjnego ROX jest konieczne we wszystkich termocyklerach firmy Applied Biosystems i opcjonalne w przypadku termocyklerów firmy Agilent. Obecność barwnika ROX nie koliduje z PCR w czasie rzeczywistym na urządzeniach niewymagających tego barwnika referencyjnego.

Barwnik niebieski

IAV Master Mix zestawu Blue Avian IAV Fast qRT-PCR Kit zawiera obojętny niebieski barwnik, który poprawia widoczność mieszaniny reakcyjnej i ułatwia kontrolę procesu pipetowania do próbek lub dołków płytki PCR.

IAV Positive Extraction Control

Produktem uzupełniającym dla zestawu Blue Avian IAV Fast qRT-PCR Kit, który można dodatkowo zamówić, jest IAV Positive Extraction Control (nr kat. E0447). IAV Positive Extraction Control jest roztworem, w postaci liofilizowanej, zawierającym inaktywowany wirus grypy typu A rozcieńczony w supernatancie wymazów z tchawicy oraz jamy nosowo-gardłowej pochodzących od ptaków negatywnych wobec wirusa. IAV Positive Extraction Control należy poddać procesowi izolacji analogicznie do analizowanych próbek.

Protokół

Przygotowanie reakcji PCR:

Składnik reakcji	Kontrola negatywna amplifikacji -NAC	Kontrola negatywna ekstrakcji-NEC	Próbka RNA	Kontrola pozytywna IAV-TPC
IAV Master Mix	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
RNase free Water	5 µl	-	-	-
Próbka oczyszczonej wody lub próbka negatywna IAV ⁻	-	5 µl	-	-
Próbka RNA	-	-	5 µl	-
Positive Control	-	-	-	5 µl
Objętość reakcji	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

Uwagi:

1. Jeśli producent urządzenia real time PCR nie zaleca inaczej, reakcje należy nastawiać w objętości 25 µl.
2. Wszystkie roztwory należy rozmrozić, delikatnie wymieszać i krótko odwirować. IAV Master Mix powinien być trzymany na lodzie, natomiast reakcje mogą być przygotowywane w temperaturze pokojowej. Należy unikać wielokrotnego (powyżej 2x) rozmrażania i zamrażania IAV Master Mix, ponieważ może to wpłynąć negatywnie na czułość reakcji.
3. Przygotować reakcje PCR zgodnie z powyższą tabelą.
4. Dodać:
 - 5 µl wody (kontrola negatywna amplifikacji-NAC),
 - 5 µl wody lub próbki negatywnej IAV⁻ oczyszczonych zgodnie z procedurą izolacji RNA (kontrola negatywna ekstrakcji-NEC),
 - 5 µl oczyszczonego RNA (próbka RNA),
 - 5 µl Positive Control (kontrola pozytywna IAV-TPC).
5. Krótko zwirować, aby osadzić roztwory na dnie probówek i usunąć pęcherzyki powietrza. Przygotowane reakcje umieścić w termocyklerze zaprogramowanym zgodnie z poniższą tabelą.

Warunki reakcji PCR:

Etap	Program standardowy	Program szybki	Ilość cykli
Odwrotna transkrypcja	50°C 10 min	50°C 10 min	1
Denaturacja wstępna	95°C 2 min	95°C 2 min	1
Denaturacja	95°C 15 s	95°C 10 s	40
Przyłączanie starterów/ wydłużanie	60°C 60 s	60°C 30 s	

Uwagi:

1. Zestaw Blue Avian IAV Fast qRT-PCR Kit umożliwia stosowanie standardowego lub szybkiego programu amplifikacji PCR zależnie od preferencji, używanego urządzenia real-time PCR.
2. Analiza fluorescencyjna w kanałach FAM, HEX powinna być wykonywana przez urządzenie na końcu etapu wydłużania. W kanale FAM wykrywane są fragmenty genów M1/M2 oraz PA wirusa grypy typu A, natomiast w kanale HEX endogenna kontrola wewnętrzna – fragment kwasu nukleinowego ptasiego genu ACTB.

Interpretacja wyników:

Rodzaj próbki	Kanał FAM	Kanał HEX	Wynik
Kontrola negatywna amplifikacji-NAC	-	-	prawidłowy
Kontrola negatywna ekstrakcji-NEC	-	-/+	prawidłowy
Kontrola pozytywna targetu IAV-TPC	+	+	prawidłowy
Próbka 1	-	+	negatywny IAV ⁻
Próbka 2	+	+	pozytywny IAV ⁺
Próbka 3	+	-	pozytywny IAV ⁺
Próbka 4	-	-	nieprawidłowy

Uwagi:

1. Test można uznać za ważny/prawidłowy jeśli:
 - kontrola negatywna amplifikacji-NAC nie daje sygnału zarówno w kanale FAM jak i HEX,
 - kontrola negatywna ekstrakcji-NEC nie daje sygnału zarówno w kanale FAM jak i HEX (dla oczyszczonej wody) lub daje sygnał wyłącznie w kanale HEX (dla próbki negatywnej IAV⁻),
 - kontrola pozytywna IAV-TPC daje sygnał w obu kanałach FAM i HEX.
2. Próbka RNA jest pozytywna (IAV⁺) i test można uznać za prawidłowy jeśli:
 - spełnione są warunki punktu 1,
 - próbka daje sygnał w kanale FAM, zarówno przy obecności, jak i braku sygnału w kanale HEX.

W sytuacjach, gdy reakcja jest silnie dodatnia (IAV⁺), próbka może dawać słaby sygnał lub całkowicie nie dawać sygnału w kanale HEX. Przyczyną tego zjawiska jest współzawodnictwo między reakcjami amplifikacji RNA wirusa grypy typu A i endogennej kontroli wewnętrznej.
3. Próbka RNA jest negatywna (IAV⁻) i test można uznać za prawidłowy jeśli:
 - spełnione są warunki punktu 1,
 - próbka daje sygnał wyłącznie w kanale HEX.
4. Obecność sygnału fluorescencji w kanale HEX dla danej próbki świadczy o poprawności przebiegu procesu izolacji RNA i reakcji PCR. Bardzo wysokie wartości C_T (>34) w kanale HEX mogą wskazywać na częściową inhibicję reakcji PCR. Z kolei całkowity brak sygnału w kanale HEX przy jednoczesnym braku sygnału w kanale FAM może wskazywać na całkowitą inhibicję reakcji PCR lub niedodanie RNA do reakcji PCR. W takim wypadku zaleca się 10-krotne rozcieńczenie próbki lub powtórzenie izolacji RNA i ponowne wykonanie reakcji PCR.
5. Brak sygnału dla kontroli pozytywnej IAV-TPC wskazuje na błąd w przygotowaniu reakcji PCR.