

Avian IAV qRT-PCR Kit

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

Avian IAV 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 rejonu w segmencie 7. wirusa kodującym białka M1, M2 oraz rejonu 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. E0445-01 100 reakcji po 25 µl	Nr kat. E0445-02 500 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) 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 Avian IAV 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. ROX kompensuje zmiany sygnału fluorescencyjnego między dołkami z powodu niewielkich różnic w objętości reakcji i fluktuacji fluorescencji. Obecność barwnika ROX nie koliduje z PCR w czasie rzeczywistym na urządzeniach niewymagających tego barwnika referencyjnego.

IAV Standard Template

Produktem uzupełniającym dla zestawu Avian IAV qRT-PCR Kit, który można dodatkowo zamówić, jest IAV Standard Template (nr kat. E0458). IAV Standard Template jest roztworem referencyjnym zawierającym syntetyczny fragment kwasu nukleinowego wirusa grypy typu A. W skład syntetycznego fragmentu wchodzi: rejon segmentu 7. wirusa kodujący białka M1, M2 oraz rejon segmentu 3. kodujący białko PA będące częścią kompleksu polimerazy RNA. IAV Standard Template może być wykorzystany jako kontrola dodatnia ekstrakcji wirusa grypy typu A dla zestawu Avian IAV qRT-PCR Kit.

**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	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Odwrotna transkrypcja	50°C	10 min	1
Denaturacja wstępna	95°C	10 min	1
Denaturacja	95°C	15 s	40
Przyłączenie starterów/ wydłużanie	60°C	60 s	

Uwagi:

1. Zestaw Avian IAV qRT-PCR Kit umożliwia stosowanie wyłącznie standardowego programu amplifikacji 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 (>35) 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.