

## Influenzavirus A qRT-PCR Detection Kit

(zestaw diagnostyczny wykrywający fragmenty genomu wirusa grypy typu A)

Influenzavirus A qRT-PCR Detection Kit jest przeznaczony do wykrywania sekwencji RNA specyficznych dla wirusa grypy typu A zarówno w próbkach ludzkich, jak i zwierzęcych (w tym 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 dwóch silnie konserwowanych rejonów w segmencie 7. wirusa kodującym białka M1, M2 oraz jednego rejonu w segmencie 3. kodującym białko PA będące częścią kompleksu polimerazy RNA. Dodatkowo zestaw zawiera kontrolę wewnętrzną (startery, sondę znakowaną barwnikiem HEX, egzogeny fragment kwasu nukleinowego—Internal Control), co pozwala na jednoczesną weryfikację procedury izolacji RNA i inhibicji reakcji PCR.

### Zawartość zestawu

Składnik	Nr kat. E0459–01 100 reakcji po 25 µl	Nr kat. E0459–02 500 reakcji po 25 µl
IAV Buffer Mix (2x) * brązowa probówka	2 x 625 µl	10 x 625 µl
IAV Enzyme Mix pomarańczowa nakrętka	100 µl	5 x 100 µl
Internal Control niebieska nakrętka	2 x 500 µl	10 x 500 µl
Positive Control** czarna nakrętka	200 µl	1000 µl
RNase free Water przeźroczysta 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.

## Barwnik referencyjny ROX

Barwnik referencyjny ROX zawarty w IAV Buffer Mix (2x) zestawu Influenzavirus A qRT-PCR Detection Kit umożliwia normalizację fluorescencji w niektórych urządzeniach real-time PCR. Użycie barwnika referencyjnego ROX jest konieczne we wszystkich termocyklarach firmy Applied Biosystems i opcjonalne w przypadku termocyklarów 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.

## Przygotowanie próbki RNA

RNA z wymazów, próbek tkanek należy wyizolować przy pomocy zestawów dedykowanych do oczyszczania RNA wirusowego. Należy postępować zgodnie z instrukcją zalecaną przez producenta zestawu.

## Kontrola wewnętrzna (ang. Internal Control)

Zestaw zawiera system kontroli wewnętrznej, który umożliwia monitorowanie procesu izolacji RNA, a także inhibicji samego procesu PCR.

System kontroli wewnętrznej składa się z:

- primerów i sondy znakowanej barwnikiem HEX obecnymi w mieszaninie reakcyjnej IAV Buffer Mix (2x),
- egzogenego fragmentu kwasu nukleinowego zawartego w Internal Control.

Kontrola wewnętrzna (Internal Control) może być dodana na etapie izolacji RNA (**pkt A**) - wtedy stanowi zarówno kontrolę procesu oczyszczania RNA, jak i inhibicji reakcji PCR lub wyłącznie na etapie PCR (**pkt B**) - do oceny jakości oczyszczonego RNA i inhibicji reakcji PCR.

- A. Kontrolę wewnętrzną (Internal Control) należy dodać do buforu lizującego lub mieszaniny buforu lizującego i pobranej próbki (nie dodawać bezpośrednio do pobranej próbki) w ilości 0,1 µl na każdy 1 µl objętości elucji. Oznacza to, że w przypadku elucji buforem elucyjnym o objętości 50 µl należy zastosować 5 µl Internal Control w procesie izolacji RNA. Zaleca się używanie nośnikowego (carrier) RNA przy izolacji wirusowego RNA. Nośnikowe RNA zwiększa wydajność wiązania RNA do membran krzemionkowych w obecności niewielkich ilości materiału genetycznego w próbce oraz zmniejsza prawdopodobieństwo degradacji wirusowego RNA.
- B. Kontrolę wewnętrzną (Internal Control) należy dodać do mieszaniny reakcyjnej w ilości 0,5 µl na każde 25 µl reakcji PCR.

## Protokół

### Przygotowanie reakcji PCR:

Składnik reakcji	Próbka RNA	Kontrola negatywna	Kontrola pozytywna
IAV Buffer Mix (2x)	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
IAV Enzyme Mix	1 µl	1 µl	1 µl
Positive Control	-	-	5 µl
Opcjonalnie (w przypadku kontroli inhibicji reakcji PCR): Internal Control	0.5 ul	0.5 ul	0.5 ul
Próbka oczyszczonego RNA	5 µl	-	-
RNase free Water	do 25 µl	do 25 µl	do 25 µl
Objętość reakcji	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 Enzyme Mix powinien być trzymany na lodzie, natomiast reakcje mogą być przygotowywane w temperaturze pokojowej. Należy unikać wielokrotnego (powyżej 2x) rozmrażania i zamrażania IAV Buffer Mix (2x), ponieważ może to wpłynąć negatywnie na czułość reakcji.
3. Przygotować jeden master mix reakcyjny poprzez wymieszanie IAV Buffer Mix (2x), IAV Enzyme Mix, wody i opcjonalnie Internal Control.
4. Rozporcjować po 20 µl mieszaniny reakcyjnej do próbek lub dołek płytki PCR.
5. Dodać 5 µl wody (kontrola negatywna), 5 µl oczyszczonego RNA (próbka RNA) lub 5 µl Positive Control (kontrola pozytywna).
6. W każdym cyklu testowym, obok badanych próbek DNA, należy nastawić co najmniej jedną kontrolę negatywną i pozytywną. Kontrola negatywna powinna być przygotowywana pierwsza, następnie próbki DNA, a na końcu kontrola pozytywna, aby zminimalizować ryzyko zanieczyszczenia.
7. Krótko zwirować, aby osadzić roztwory na dnie próbek i usunąć pęcherzyki powietrza.
8. Przygotowane reakcje umieścić w termocyklerze zaprogramowanym zgodnie z poniższą tabelą.

### Warunki reakcji PCR:

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Odwrotna transkrypcja	50°C	15 min	1
Denaturacja wstępna	95°C	2 min	1
Denaturacja	95°C	10 s	40-45
Przyłączanie starterów/ wydłużanie	60°C	45 s	

This product is developed, designed and sold exclusively for in vitro use only.

**Uwagi:**

1. Należy stosować standardowe tempo zmian temperatury reakcji PCR (ang. standard ramp, standard mode).
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 kontrola wewnętrzna—egzogenny fragment kwasu nukleinowego.

**Interpretacja wyników:**

Rodzaj próbki	Kanał FAM	Kanał HEX	Wynik
Kontrola negatywna	-	+	prawidłowy
Kontrola pozytywna	+	+	prawidłowy
1	-	+	negatywny IAV <sup>-</sup>
2	+	+	pozytywny IAV <sup>+</sup>
3	+	-	pozytywny IAV <sup>+</sup>
4	-	-	nieprawidłowy

**Uwagi:**

1. Test można uznać za ważny/prawidłowy jeśli: kontrola pozytywna daje sygnał w obu kanałach, natomiast kontrola negatywna daje sygnał wyłącznie w kanale HEX.
2. Próbkę RNA jest pozytywna (IAV<sup>+</sup>) i test można uznać za prawidłowy jeśli:
  - Spełnione są warunki punktu 1,
  - Próbka daje sygnał w kanale FAM (przy wartości  $C_T \leq 38$ ) oraz w kanale HEX dla kontroli wewnętrznej.
 W wyjątkowych sytuacjach, gdy reakcja jest silnie dodatnia (IAV<sup>+</sup>), 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 kontroli wewnętrznej (Internal Control).
3. Próbkę RNA jest negatywna (IAV<sup>-</sup>) 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 (w przypadku dodania kontroli wewnętrznej do procesu izolacji RNA), bądź wyłącznie o braku inhibicji PCR (w przypadku dodania kontroli wewnętrznej do mieszaniny reakcyjnej 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 przy jednoczesnym dodaniu kontroli wewnętrznej w procesie izolacji RNA. W takim wypadku zaleca się 10-krotne rozcieńczenie próbki lub powtórzenie izolacji RNA i ponowne wykonanie reakcji PCR.
5. Brak sygnału dla kontroli pozytywnej wskazuje na błąd w przygotowaniu reakcji PCR.