

H5/H7 IAV qRT-PCR Kit

(zestaw diagnostyczny wykrywający fragmenty genomu podtypów H5 i H7 wirusa grypy
typu A u ptaków)

H5/H7 IAV qRT-PCR Kit jest przeznaczony do jednoczesnego wykrywania i różnicowania sekwencji RNA specyficznych dla podtypów H5 i H7 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 podtypów H5 i H7 wirusa grypy typu A. Sonda specyficzna dla podtypu H5 jest znakowana barwnikiem fluorescencyjnym FAM, natomiast sonda specyficzna dla podtypu H7 jest znakowana barwnikiem fluorescencyjnym HEX. Dodatkowo zestaw zawiera kontrolę wewnętrzną (startery, sondę znakowaną barwnikiem Texas Red, egzogeny fragment kwasu nukleinowego), co pozwala na ocenę poprawności i ewentualnej inhibicji reakcji PCR.

Zawartość zestawu

Składnik	Nr kat. E0465
	96 reakcji po 25 µl
RT-PCR Mix pomarańczowa nakrętka	2 x 990 µl
Primers/Probes brązowa probówka	1 x 210 µl
PC — positive control czarna nakrętka	1 x 150 µl
NC — negative control przezroczysta nakrętka	1 x 150 µl

Przechowywanie

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

Unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania (>2), ponieważ może to zmniejszyć czułość testu. Składniki zestawu należy zamrozić w mniejszych porcjach, jeśli są używane 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 podtypów H5 i H7 wirusa grypy typu A zarówno w pojedynczych próbkach, jak i w próbkach zmieszanych (pulowanych) w ilości maksymalnie 10 próbek indywidualnych.

Barwnik niebieski

RT-PCR Mix zestawu H5/H7 IAV qRT-PCR Kit zawiera obojętny niebieski barwnik, który poprawia widoczność mieszaniny reakcyjnej i ułatwia kontrolę procesu pipetowania do probówek lub dołków płytki PCR.

Protokół Przygotowanie Master Mixu:

Składnik reakcji	Ilość reakcji		
	1	24	96
RT-PCR Mix	18 µl	432 µl	1728 µl
Primers/Probes	2 µl	48 µl	192 µl
Objętość całkowita	20 µl	480 µl	1920 µl

Uwagi:

1. Wszystkie roztwory należy rozmrozić, wymieszać i krótko odwirować.
2. Składniki zestawu oraz przygotowywane mieszaniny reakcyjne powinny być trzymane na lodzie lub w bloku chłodzącym.
3. Przygotować Master Mix zgodnie z powyższą tabelą. Objętość Master Mixu powinna być większa (np. o 10%) od objętości potrzebnej do przygotowania całkowitej ilości reakcji PCR (należy uwzględnić straty podczas pipetowania).
4. Master Mix powinien być przygotowywany bezpośrednio przed reakcją PCR (nie zaleca się przechowywania przygotowanego Master Mixu).
5. Wymieszać Master Mix, krótko odwirować.
6. Dodać 20 µl Master Mixu do próbki reakcyjnej/dołka płytki.

Przygotowanie reakcji PCR:

Składnik reakcji	Kontrola negatywna amplifikacji-NAC	Kontrola negatywna ekstrakcji-NEC	Próbka RNA	Kontrola pozytywna H5/H7 IAV-TPC
Master Mix	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
NC — negative control	5 µl	-	-	-
Próbka negatywna H5/H7 IAV ⁻ lub próbka oczyszczonej wody	-	5 µl	-	-
Próbka RNA	-	-	5 µl	-
PC — positive control	-	-	-	5 µl
Objętość całkowita	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

Uwagi:

1. Przygotować reakcje PCR zgodnie z powyższą tabelą.
2. Dodać:
 - 5 µl NC—negative control (kontrola negatywna amplifikacji-NAC),
 - 5 µl próbki negatywnej H5/H7 IAV⁻ lub wody oczyszczonych zgodnie z procedurą izolacji RNA (kontrola negatywna ekstrakcji-NEC),
 - 5 µl oczyszczonego RNA (próbka RNA),
 - 5 µl PC—positive control (kontrola pozytywna H5/H7 IAV-TPC).
3. Krótco 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	2 min	1
Denaturacja	95°C	10 s	40
Przyłączanie starterów/ wydłużanie	60°C	30 s	

Uwagi:

1. Analiza fluorescencyjna w kanałach FAM, HEX, Texas Red/ROX powinna być wykonywana przez urządzenie na końcu etapu wydłużania. W kanałach FAM i HEX wykrywane są odpowiednio fragmenty genomu podtypu H5 i H7 wirusa grypy typu A, natomiast w kanale Texas Red/ROX egzogenna kontrola wewnętrzna.
2. W przypadku urządzeń real-time PCR firmy Applied Biosystems analizę prowadzić bez udziału barwnika referencyjnego ROX.

Interpretacja wyników:

Rodzaj próbek	Kanał FAM	Kanał HEX	Kanał Texas Red/ROX	Wynik
Kontrola negatywna amplifikacji-NAC	-	-	+	prawidłowy
Kontrola negatywna ekstrakcji-NEC	-	-	+	prawidłowy
Kontrola pozytywna H5/H7 IAV-TPC	+	+	+	prawidłowy
Próbka 1	-	-	+	negatywny H5 ⁻ negatywny H7 ⁻
Próbka 2	+	-	+/-	pozytywny H5 ⁺
Próbka 3	-	+	+/-	pozytywny H7 ⁺
Próbka 4	+	+	+/-	pozytywny H5 ⁺ pozytywny H7 ⁺
Próbka 5	-	-	-	nieprawidłowy

Uwagi:

- Test można uznać za ważny/prawidłowy jeśli:
 - kontrola negatywna amplifikacji-NAC daje sygnał wyłącznie w kanale Texas Red/ROX,
 - kontrola negatywna ekstrakcji-NEC daje sygnał wyłącznie w kanale Texas Red/ROX,
 - kontrola pozytywna H5/H7 IAV-TPC daje sygnał w kanałach FAM, HEX i Texas Red/ROX.
- Próbka RNA jest pozytywna dla podtypu H5 wirusa grypy typu A 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 Texas Red/ROX.
- Próbka RNA jest pozytywna dla podtypu H7 wirusa grypy typu A i test można uznać za prawidłowy jeśli:
 - spełnione są warunki punktu 1,
 - próbka daje sygnał w kanale HEX, zarówno przy obecności, jak i braku sygnału w kanale Texas Red/ROX.
- Próbka RNA jest pozytywna jednocześnie dla podtypów H5 i H7 wirusa grypy typu A i test można uznać za prawidłowy jeśli:
 - spełnione są warunki punktu 1,
 - próbka daje sygnał w kanałach FAM i HEX, zarówno przy obecności, jak i braku sygnału w kanale Texas Red/ROX.

W sytuacjach, gdy reakcja jest silnie dodatnia dla podtypu H5 i/lub H7 wirusa grypy typu A (H5⁺ i/lub H7⁺), próbka może dawać słaby sygnał lub całkowicie nie dawać sygnału w kanale Texas Red/ROX. Przyczyną tego zjawiska jest współzawodniczenie między reakcjami amplifikacji RNA wirusa grypy typu A i egzogennej kontroli wewnętrznej.

- Próbka RNA jest negatywna dla obu podtypów H5 i H7 wirusa grypy typu A i test można uznać za prawidłowy jeśli:
 - spełnione są warunki punktu 1,
 - próbka daje sygnał wyłącznie w kanale Texas Red/ROX.
- Obecność sygnału fluorescencji w kanale Texas Red/ROX dla danej próbki świadczy o poprawności przebiegu reakcji PCR. Wyższe wartości C_T w kanale Texas Red/ROX dla danej próbki w stosunku do większości innych próbek, może wskazywać na częściową inhibicję reakcji PCR. Z kolei całkowity brak sygnału w kanale Texas Red/ROX przy jednoczesnym braku sygnału w kanałach FAM i HEX może wskazywać na całkowitą inhibicję reakcji PCR. W takich przypadkach zaleca się 10-krotne rozcieńczenie próbki lub powtórzenie izolacji RNA i ponowne wykonanie reakcji PCR.
- Brak sygnału dla kontroli pozytywnej H5/H7 IAV-TPC wskazuje na błąd w przygotowaniu reakcji PCR.