

Vérparazita mikoplazmák kimutatási készlete

(PCR-fluoreszcens próba módszer)

Használati útmutató

(REF: JVP027)

[Terméknév]

Magyar megnevezés: Vérparazita mikoplazmák kimutatási készlete (PCR-fluoreszcens próba módszer)

[Csomagolási kiszerezés]

8 T/készlet

[Alkalmazási terület]

A készlet fluoreszcens PCR módszert alkalmaz a háziállatok vérmintáiban található vérparazita mikoplazmák kimutatására. Alkalmos az alábbi kórokozók kimutatására, diagnosztikájára és járványtani vizsgálatára:

- Ohio törzs (Mycoplasma hemofelis, Mhf)
- Zürich törzs (Candidatus Mycoplasma turicensis, Mtc)
- Kaliforniai törzs (Candidatus Mycoplasma haemominutum, Mhm)
- Mycoplasma haemo-canis (Mhc)
- Candidatus Mycoplasma haematoparvum (CMhp)

[Vizsgálati elv]

A minták nukleinsavát (DNS/RNS) nukleinsav-extrakciós reagens segítségével vonják ki. Hatékony reverz transzkriptáz enzim közreműködésével az RNS mint templát alapján komplementer cDNS-lánc szintetizálódik. Taq-polimeráz enzim jelenlétében a DNS templátul szolgál, és a specifikus célszekvencia-fragmentek kópiaszáma magas hőmérsékleten végzett denaturálás, majd közepes hőmérsékleten végzett primer-kötés (annealing) és lánchosszabbítás (extenzió) ismételt ciklusa révén megsokszorozódik. A fluoreszcensen jelölt specifikus próba és a meghosszabbított célfragment hibridizációja, valamint a Taq-polimeráz 5'3' exonukleáz-aktivitásának felhasználásával a fluoreszcens próba riporter génje és quencher génje szétválik, és specifikus fluoreszcens jel keletkezik. A fluoreszcens jelet fluoreszcens PCR-berendezéssel detektálják. Az eredményt a minta Ct-értéke és az amplifikációs görbe alakja alapján értékelik.

[A készlet összetevői és specifikációi]

Összetevő	Mennyiség
Nukleinsav-extrakciós reagens készlet	8 db
Mágneses rúd borítója	8 db
PCR amplifikációs reagens – PCR liofilizált reagens	8 db

Egyszer használatos mintavételi készlet – Tampon (swab)	8 db
Egyszer használatos mintavételi készlet – Mintamegőrző reagens	8 cső
Kezelési útmutató	1 db

[Tárolási feltételek és szavatosság]

A nukleinsav-extrakciós reagenst szobahőmérsékleten kell tárolni. A PCR liofilizált reagenst szobahőmérsékleten, fénytől védve kell tárolni.

A készlet szavatossági ideje: 2–8 °C-on tárolva 18 hónap; 8–30 °C-on tárolva 12 hónap. A készletet a szavatossági időn belül kell felhasználni.

[A műszer üzemeltetési környezete]

A vizsgálatot 20–25 °C közötti környezeti hőmérsékleten javasolt elvégezni.

[Mintatípus]

EDTA-s vérminta

[Mintavételi követelmények]

Folyékony minták (vérminta, ascites, mellhártyafolyadék):

Pipettával vegyen 200 µL mintát, és adja a mintamegőrző reagenshez, majd rázza össze alaposan. Ha a minta túl sűrű vagy koncentrált, felhasználás előtt hígítani kell. Vizelet- és liquorminta esetén 200 µL-t közvetlenül az LB csőbe javasolt pipetázni az extrakció elvégzéséhez.

Tamponnál (swab) vett minták:

1. Bélsártampon: A tamponnal vegye fel a megfelelő mennyiségű mintát.
2. Végbéltampon: Előbb nedvesítse meg a tampont hígítóval, majd törölje le a mintát.
3. Nasopharyngealis tampon: A szemhéj alá helyezett tamponnal gyűjtsön szemvázadékokat; tamponnal törölje le közepesen az orális és nasalis váladékot a nasopharyngealis tamponmintához.
4. A tamponminta vétele után a tamponfejet gyorsan törje bele a mintamegőrző oldatba, majd alaposan rázza fel, hogy a kórokozók teljesen feloldódjanak a mintamegőrző oldatban.

A mintavétel befejezése után a nukleinsav-extrakciót azonnal el kell végezni; szükség esetén a minta átmenetileg 4 °C-on tárolható, vagy hosszú távon -20 °C alatt; szállításkor hidegláncot kell fenntartani.

[Kísérleti előkészületek]

5. A kísérlet megkezdése előtt kérjük, gondosan olvassa el ezt az útmutatót, ismerkedjen meg az egyes lépésekkel, és a készletet kizárólag az útmutatóban foglaltak szerint használja.

6. A kezelő a műveletek során viseljen egyszer használatos kesztyűt és szájmascot; minden műveletet a PCR-detektálási kísérletekre vonatkozó környezeti feltételeknek megfelelő körülmények között kell elvégezni.
7. A minták számának megfelelő mennyiségű extrakciós reagens-kazettát vegyen elő. A kazettán lévő lyukak oldalán feltüntetett jelölések szerint azonosítsa az egyes pozíciókat.

[Műveleti lépések]

Nukleinsav-extrakció:

[ÁBRA: A nukleinsav-extrakciós kazetta felülnézeti vázlatrajza. A kazetta hat egymás melletti lyukat (kútpozíciót) tartalmaz, amelyek balról jobbra a következőképpen vannak jelölve: LB (mintabeviteli pozíció), W1 (1. mosópuffer-pozíció), W2 (2. mosópuffer-pozíció) és EB (elúciós/nukleinsav-gyűjtő pozíció). A pozíciók alatt körök jelölik a sorrendi számokat (1-től 6-ig). Két rövidítés magyarázata szerepel a rajzon: „LB: Add Sample” (LB: minta hozzáadása) és „EB: Extracted Nucleic Acids” (EB: kivont nukleinsavak).]

8. Vegye ki a szükséges mennyiségű extrakciós reagens-kazettát, és a jelölések alapján távolítsa el a felső lezáró fóliát. A kazetta egyes pozícióit a vázlatrajz mutatja.
9. Pipettával vegyen 200 µL mintát, és adja az LB pozícióba.
10. Vegyen elő egy mágneses rúdborítót, és helyezze a készlet mágneses rúdborító-tartójába.
11. Nyomja meg a berendezésen az „In/Out” gombot, helyezze a kazettát a kazett-tartóra az automatikus extrakció elvégzéséhez, majd nyomja meg ismét az „In/Out” gombot, hogy a kazetta bemenjen a műszerbe, és zárja be a kamra ajtaját.

Megjegyzés: A kazettát a tartóra az oldalán feltüntetett iránya szerint kell elhelyezni, és egyenesen kell a tartó aljára fektetni. Ha a kazetta megfelelően van elhelyezve, a műszer kezelőpaneljén a megfelelő csatorna piros jelzőfénye felgyullad; ellenkező esetben a jelzőfény nem gyullad fel.

12. Nyomja meg a „Run” gombot, hogy a berendezés megkezdje a nukleinsav-extrakciót; várja meg, amíg a berendezés befejezi a futást és megszólal a csipogás, majd nyomja meg ismét az „In/Out” gombot a kazetta kivételéhez.

Megjegyzés: A kivont nukleinsav-mintát azonnal ajánlott feldolgozni. Ha a mintát átmenetileg nem használják fel, -20 °C-on vagy -80 °C-on kell tárolni.

PCR-amplifikáció:

13. Pipettával vegyen 20 µL nukleinsav-felülúszót az EB pozícióból, és adja a PCR-reagens csőhöz; ujjával koppintgassa meg a reagenscsövet, hogy a liofilizált por egyenesen feloldódjon; centrifugálással juttassa az összes folyadékot a cső aljára, majd helyezze a csövet a PCR-műszer reakciókútjába.

Megjegyzések:

- a) Pipettával a nukleinsav-oldatot szívva fel, ügyeljen arra, hogy ne szívjon fel buborékokat.
- b) A liofilizált reagenst alaposan össze kell keverni, és az összes reakciófolyadékot a cső aljára kell centrifugálni; ellenkező esetben a háttér-interferencia-jel valószínűleg túl erős lesz, és befolyásolja az eredmény értékelését.

14. Válassza ki a kisállat-kórokozóhoz tartozó megfelelő programot, adja meg a minta- és vizsgálati tételinformációkat, majd kattintson a Futtatás ikonra a reakció elindításához.

- c) A reakció befejezése után vegye ki a PCR-terméket tartalmazó kémcsövet, és zárható tasakban adja le ártalmatlanítás céljából.

Mintainformáció beállítása: Ellenőrizze, hogy a PCR-cső ugyanazon a kútpozíción van-e, mint amelyet a műszerben beállított. Ha a PCR-csövet az amplifikációs kamra 1# pozíciójába helyezi, a mintabeállítási felületen a megfelelő 1# pozíciót válassza ki. Mintanév és a vizsgálati tétel megadása után kattintson a Futtatás ikonra a PCR-amplifikációs reakció elindításához.

[Eredmény értékelése]

15. Ha a FAM-detektálási csatornán tipikus S-alakú amplifikációs görbe jelenik meg, és a Ct-érték < 36, az eredmény pozitívnak tekinthető.
16. Ha a FAM-detektálási csatornán nem jelenik meg tipikus S-alakú amplifikációs görbe, és nincs Ct-érték, vagy a Ct-érték ≥ 36 , az eredmény negatívnak tekinthető.

[Jelölések magyarázata]

[ÁBRA: A terméken és csomagoláson alkalmazott szimbólumok táblázata. Négy oszlopból áll: Jelölés | Jelentés | Jelölés | Jelentés. Az egyes sorok tartalma: 1. sor: Gyártási hullám szimbólum (hullámos vonal) | Gyártás dátuma | Dokumentum szimbólum (i felirattal, keretben) | Lásd a használati útmutatót 2. sor: Épület szimbólum | Gyártó | Tiltó kör X-szel | Nem használható újra 3. sor: LOT | Tételszám | Nap sugarakkal (áthúzva) | Fénytől védve tárolandó 4. sor: Hőmérő szimbólum | Hőmérsékleti korlát | Háromszög szimbólum | Elegendő <n> vizsgálathoz 5. sor: Naptár/dátum szimbólum | Felhasználhatósági dátum | REF | Katalógusszám]

[A kimutatási módszer korlátai]

17. Az amplifikációs termékek aeroszolszennyeződése könnyen álpozitív eredményt okozhat; ezért a vizsgálólaboratóriumot szigorúan a PCR-vizsgálati laboratóriumokra vonatkozó követelmények szerint kell kialakítani.
18. A negatív eredmény nem zárja ki teljesen a kórokozó-fertőzés lehetőségét; az eredményt más klinikai mutatókkal együtt kell értékelni.

[Termékteljesítmény-mutatók]

19. Érzékenység: A készlet kimutatási határa 1000 kópia/ml.
20. Specifitás: A készlet nem mutat keresztreakciót kalicivírus-, herpeszvírus-, Chlamydia- és Ehrlichia-mintákkal.
21. Precizitás: Egy erősen pozitív és egy gyengén pozitív mintán 10-szeres ismétlésben elvégzett mérések során a Ct-érték variációs koefficiense (CV) 5% alatt maradt.

[Óvintézkedések]

22. Termék ellenőrzése: A PCR-amplifikációs reagensek használata előtt nyissa ki a csomagolást, és ellenőrizze, hogy a cső alján a liofilizált por megfelelő állapotban van-e (fehér, összetapadt). Ha a por folyékony állagúvá vált, a reagens nem használható, mert befolyásolja a PCR eredményét.
23. Pipetta használata: A PCR-amplifikáció sablonjaként 20 μ L nukleinsav-felülúszó pipettázásakor a pipettát csak az első fokozatig nyomja le (nem az aljáig), különben az eltávolított folyadék mennyisége meghaladhatja a 20 μ L-t, ami befolyásolja a vizsgálat eredményét.