Test RealPCR PCV2/PCV3 Multiplex DNA

Pouze pro veterinární účely.

Název a určené použití

Test RealPCR PCV2/PCV3 Multiplex DNA je určen k detekci, diferenciaci a kvantifikaci DNA prasečího cirkoviru typu 2 (PCV2) a prasečího cirkoviru typu 3 (PCV3). Test je možné použít s DNA extrahovanou z prasečího séra, orálních tekutin, tkání, plicní laváže, procesních tekutin a tkání plodů/mrtvě narozených selat (PCV3). Test může být použit pro testování směsných vzorků sestávajících až z 10 vzorků.

Obecné informace

Prasečí cirkovirus typu 2 (PCV2) je ekonomicky významný patogen, který je spojen s širokou škálou klinických onemocnění včetně PCV2 systémového onemocnění (PCV2-SD), respiračního a střevního onemocnění, poruch reprodukce a syndromu dermatitidy a nefropatie prasat. PCV2-SD a subklinické infekce jsou celosvětově velmi rozšířené. Předpokládá se, že infekce prasat prasečím cirkovirem typu 3 (PCV3) je spojena s okolnostmi, které připomínají onemocnění vyvolané prasečím cirkovirem1. PCV3 byl identifikován ve většině zemí s rozvinutou produkcí prasat a retrospektivní studie naznačují, že v populacích prasat koluje již několik desetiletí. Detekce DNA virů PCV2 a PCV3 pomocí multiplexní PCR v reálném čase je mimořádně citlivým a rychlým prostředkem kvantifikace virové nálože a diferenciace klinicky významných infekcí prasečím cirkovirem během jedné reakce.

K vytvoření standardní křivky pro kvantifikaci virové nálože ve vzorcích je možné použít standardy RealPCR PCV2/PCV3 DNA Quantification Standards (PCV2 DNA QS a PCV3 DNA QS), obsahující syntetickou DNA PCV2 a PCV3.

IDEXX RealPCR je modulární systém, v němž jsou cílové směsi specifické pro dané onemocnění spárovány se standardizovanými směsmi vzorové DNA nebo RNA a jednou směsnou pozitivní kontrolou. Reagencie jsou baleny individuálně a prodávány zvlášť, aby s nimi bylo možné manipulovat, pokud možno flexibilně.

Směs RealPCR PCV2/PCV3 Multiplex DNA Mix (PCV2/PCV3 DNA Mix) obsahuje primery a sondy pro multiplexní detekci a diferenciaci DNA virů PCV2 PCV3 při amplifikaci se směsí vzorové RealPCR Master DNA (DNA MMx). Design pro typ PCV2 využívá sondu FAM™, zatímco design pro PCV3 signalizuje v kanálu Cy5. Interní kontrola testu vychází z průkazu sekvence genomové DNA ve vzorku, která je u prasat zachována. Tento genomový cíl se v tomto protokolu označuje jako interní kontrola vzorku (ISC). Průkaz endogenní DNA v testovaných vzorcích kontroluje adici, extrakci a amplifikaci vzorku. Směs PCV2/PCV3 DNA Mix obsahuje primery a sondu pro průkaz interní kontroly vzorku. K dispozici je také volitelná interní pozitivní kontrola, jmenovitě interní pozitivní kontrola RealPCR (IPC> v1.1), kterou je třeba použít v případě nízké hladiny endogenní hostitelské DNA nebo v situaci, kdy je její přítomnost po extrakci nepravděpodobná. IPC obsahuje syntetickou verzi porcinního cíle ISC DNA a je tudíž kompatibilní se směsí PCV2/PCV3 DNA Mix. Viz pokyny v příbalovém letáku k interní pozitivní kontrole RealPCR (REF 99-56330).

1. Segales J, Allan GM, Domingo M, et al. 2019. Diseases of swine. 11th edition. Wiley Blackwell. Kapitola 30, str. 473.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Materiál a uchovávání | | | | | |
| Označení / obecné informace | Barva uzávěru | Množství | Uchovávání | | Cykly zmrazení/  rozmrazení |
|  |  | 100 testů | Při převzetí | Po rekonstituci |  |
| Směs RealPCR PCV2/PCV3 Multiplex DNA Mix (PCV2/PCV3 DNA Mix), suchá | Zelená | 1 x 1,0 ml | -25 až 8 °C | -25 až -15 °C | ≤6 |
| 99-56040  Rekonstituujte pomocí čištěné vody určené pro metodu PCR (PCR Grade Water) pro dosažení objemu 1 ml. Směs PCV2/PCV3 DNA Mix uchovávejte v temnu. Datum exspirace na lahvičce platí pro suchou i rekonstituovanou formu. Etiketa na zkumavce se směsí PCV2/PCV3 DNA Mix označuje verzi PC, která je kompatibilní s cílovou směsí. Příklad: PC > v1.4 znamená, že cílovou směs je možné použít s PC verzí 1.4 a novějšími verzemi. | | | | | |
| Vzorová směs RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx) | Fialová | 1 x 1,0 ml | -25 až -15 °C (dlouhodobě) | N/A | ≤6 |
| 99-56250  Koncentrovaná vzorová směs, která obsahuje hot-start polymerázu pro použití s cílovými směsmi DNA v systému IDEXX RealPCR. DNA MMx je viskóznější než většina vzorových směsí – doporučený způsob manipulace viz část Postup testování. Pro normalizaci objemových nepřesností bylo přidáno referenční barvivo (ROX™). Směs DNA MMx chraňte před světlem. | | | | | |
| Pozitivní kontrola RealPCR, suchá (PC) | Modrá | 1 x 500 µl | -25 až 8 °C | -25 až -15 °C | ≤6 |
| 99-56310  Rekonstituujte pomocí čištěné vody určené pro metodu PCR (PCR Grade Water) pro dosažení objemu 500 µl. PC obsahuje všechny cíle (targets) IDEXX RealPCR a ISC (včetně cíle pro PCV2 a PCV3) a je určena k použití se všemi cílovými směsmi IDEXX RealPCR. Datum exspirace na lahvičce platí pro suchou i rekonstituovanou formu. PC je označena číslem verze (např. v1.3). Jakmile jsou pro produktovou řadu RealPCR vytvořeny nové cílové směsi, cílové sekvence jsou přidány do PC a číslo verze PC se aktualizuje (např. v1.3 se zvýší na v1.4).  PC zahrnuje Signaturu IDEXX (unikátní sekvence oligonukleotidů). Přítomnost Signatury IDEXX v pracovním prostředí poukazuje na kontaminaci PC. Laboratoře, které chtějí monitorovat kontaminaci PC, mohou detekovat Signaturu IDEXX s použitím směsí RealPCR PC Tracker DNA Mix a RealPCR DNA MMx. | | | | | |
| Voda RealPCR PCR Grade | Čirá | 2 x 1,0 ml | -25 až 8 °C | | N/A |
| 99-56350  Čištěná voda určená pro PCR metodu (PCR Grade Water) je kvalifikována pro použití při reverzní transkripci-PCR (RT-PCR). Používá se k rekonstituci reagencií RealPCR. Používá se také jako PCR negativní kontrola pro každou testovací várku. Lahvičky s touto vodou nepřesunujte mezi různými pracovními oblastmi PCR. Pro každou oblast je nutné použít samostatnou lahvičku s vodou, aby nedošlo ke kontaminaci. | | | | | |
| Poznámka: V tabulce na konci tohoto dokumentu je uveden popis symbolů používaných v příbalové informaci a na etiketě. | | | | | |

Potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy

* Komerční souprava pro extrakci DNA
* Volitelné – centrifuga s rotorem a adaptéry pro destičky s více jamkami
* Mikrocentrifuga pro odstřeďování mikrozkumavek o objemu 2 ml, která může dosáhnout 1500 až 3000 × g
* Vhodné osobní ochranné pomůcky (např. rukavice, laboratorní plášť)
* Pipetové špičky odolné vůči aerosolům a neobsahující nukleázu
* Sterilní mikrozkumavky pro přípravu směsi PCR
* Pipety (5 až 1000 µl); speciální pipety pro přípravu směsi PCR
* 96 nebo 384jamkové PCR destičky a optické adhezivní fólie/kryty destiček
* Přístroj pro provádění PCR v reálném čase (Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® 7500 Fast systém [standardní a rychlý režim], Applied Biosystems® QuantStudio™ 5, Agilent Mx3000P™, Agilent Mx3005P™, Agilent AriaMx, Bio-Rad CFX96 Touch™, Applied Biosystems QuantStudio™ Flex, Bio Molecular Systems Mic qPCR Cycler, QIAGEN Rotor-Gene® [pouze 72jamkový rotor], Roche LightCycler® 480 nebo podobný). Poznámka: Přístroj Roche LC480 vyžaduje další kalibraci a nastavení softwaru. Informace o používání výše uvedených přístrojů s reagenciemi RealPCR vám poskytnou pracovníci odborné podpory IDEXX.

Laboratorní postupy a varování

* Nepoužívejte reagencie po datu exspirace.
* Celý proces je nutné provádět za nepřítomnosti nukleázy.
* Při práci s reagenciemi a nukleovými kyselinami používejte rukavice bez pudru.
* Pro zabránění zkřížené kontaminace provádějte veškeré příslušné činnosti s použitím špiček pipet bez nukleázy, které jsou odolné vůči aerosolům, a fyzicky separujte pracoviště, kde dochází k extrakci nukleové kyseliny (a manipulaci s ní), nastavení PCR a provádění PCR.

Rekonstituce suchých složek

Směs PCV2/PCV3 DNA Mix a pozitivní kontrolu rekonstituujte pipetováním vody PCR Grade pro dosažení objemu uvedeného na etiketě příslušné složky. Roztok nechte stát po dobu nejméně 10 minut při teplotě 18 až 26 °C. Před použitím promíchejte a krátce odstřeďte pomocí mikrocentrifugy. Po rekonstituci směsi PCV2/PCV3 DNA Mix a pozitivní kontroly připravte příslušné alikvoty a roztoky uchovávejte ve zmrazeném stavu. Zmražené složky nechte před použitím rozmrazit po dobu přibližně 15 až 30 minut při teplotě 18 až 26 °C, jemně je promíchejte a krátce odstřeďte pomocí mikrocentrifugy (~1 500 až 3 000 × g).

Rekonstituce kvantifikačních standardů

Kvantifikační standardy RealPCR PCV2/PCV3 DNA Quantification Standards (#99-56720) mají dvě samostatné lahvičky obsahující syntetickou DNA PCV2 (PCV2 DNA QS) a syntetickou DNA PCV3 (PCV3 DNA QS). Datum exspirace na lahvičce platí pro suchou i rekonstituovanou formu.

Poznámka: Kvantifikační standardy jsou dodávány ve vysoké koncentraci. Při těchto koncentracích hrozí zvýšené riziko kontaminace laboratoře a/nebo zařízení. Při manipulaci s materiálem dbejte zvýšené opatrnosti.

Před rekonstitucí neotevřené lahvičky krátce odstřeďte. Do každé lahvičky přidejte 100 µl vody PCR Grade Water pro konečnou koncentraci 1,0 x 109 kopií/ml [což odpovídá 5 milionům kopií/reakci] DNA PCV2 a PCV3. Rekonstituované kvantifikační standardy je možné uchovávat ve zmrazeném stavu při teplotě < -15 °C po dobu až 6 měsíců a je možné je až 3x zmrazit a rozmrazit. Pro minimalizaci počtu rozmrazení a zmrazení připravujte příslušné alikvoty.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Extrakce DNA | |  |
| Směs PCV2/PCV3 DNA Mix byla validována pomocí níže uvedených komerčních extrakčních metod. Je možné použít také další metody extrakce a lýzy, pokud byly validovány v laboratoři. | | |
| Souprava RealPCR\* DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX)  Souprava RealPCR\* DNA/RNA Spin Column Kit (IDEXX)  Souprava MagMAX™-96 Viral RNA Isolation Kit (Life Technologies)  Souprava MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) | | |
| Pokud není test proveden okamžitě po extrakci DNA, uchovávejte přečištěnou DNA při teplotě < -15 °C. Jako vzorek by měla být zahrnuta také negativní kontrola pro extrakci („mock sample“). | | |
| Postup testu | | |
| 1 | Příprava směsi PCR Master Mix. |  |
|  | • Rozmrazenou směs DNA MMx promíchejte převrácením nebo jemným vortexováním zkumavky.  • DNA MMx je viskózní roztok, který je nutné pipetovat pomalu.  • Směs PCR Mix připravíte aplikací 10 µl směsi PCV2/PCV3 DNA Mix a 10 µl DNA MMx na každou reakci.  • Při přípravě směsi PCR Mix nejprve pipetujte směs PCV2/PCV3 DNA Mix do zkumavky a poté přidejte směs DNA MMx. Propláchněte špičku pipety s MMx tak, že roztok několikrát nasajete do pipety a opět jemně vypustíte.  • Důkladně promíchejte jednotlivé složky mírným vortexováním roztoku.  • Směs PCR Mix pomalu pipetujte na PCR destičku. | |
|  | Směs PCR Mix je možné uchovávat po dobu 24 hodin při teplotě 2 až 8 °C nebo po dobu 2 týdnů při teplotě -25 až -15 °C. Chraňte před světlem. | |
| 2 | Pipetou přeneste 20 µl směsi PCR Mix do příslušných jamek destičky s více jamkami. | |
| 3 | Do každé jamky přeneste 5 µl vzorku DNA. Konečný objem pro reakci je 25 µl. | |
| 4 | Pro každou testovací várku přidejte pozitivní kontrolu (5 µl) a PCR negativní kontrolu (5 µl vody PCR Grade Water). | |
| 5 | Destičku uzavřete krytem, a pokud je třeba, jemně ji odstřeďte, aby se obsah jamek usadil a uvolnily se vzduchové bublinky. | |
| 6 | Pomocí programu IDEXX RealPCR Standard DNA/RNA Cycling Program nastavte termocykler. | |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Nastavení reportéru a zhášeče | | | |
| Cíl |  | Reportér | Zhášeč |
| PCV2 |  | FAM™ | BHQ®  (není) |
| PCV3 |  | Cy5 | BHQ  (není) |
| Interní kontrola |  | HEX™ (VIC®) | BHQ  (není) |
| Pasivní reference |  | ROX™ | N/A |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Program RealPCR\* Standard DNA/RNA Cycling Program | | | |
|  | Teplota | Čas | Cykly |
| Reverzní transkripce  (RT) | 50 °C | 15 min | 1 |
| Denaturace | 95 °C | 1 min | 1 |
| Amplifikace\*\* | 95 °C | 15 s | 45 |
| 60 °C | 30 s |

\*\*Nastavte přístroj tak, aby zaznamenával fluorescenci až po amplifikaci při 60 °C.

Poznámka: Pro cíle DNA je možné spustit standardní protokol bez kroku RNA „RT“. Doporučujeme nicméně krok „RT“ používat rutinně, aby bylo možné testy RNA snadněji zařadit do pracovního postupu.

**7** Analýza dat

Při nastavování softwaru přístroje zadejte každému cíli a interní kontrole unikátní identifikátor. Příklad: Pokud jsou cíle A a B na téže destičce, jamky A musí být analyzovány nezávisle na jamkách B. Způsob analýzy dat je uveden v konkrétním návodu k použití daného přístroje. Pro nastavení prahu použijte funkci Auto Ct.

• Agilent Mx3000P a Mx3005P – pro analýzu je nutné používat metodu fluorescence s prahovou hodnotou založenou na pozadí (background-based threshold fluorescence method).

• Přístroj QIAGEN Rotor-Gene – ručně nastavte prahovou přímku nad pozadí v lineární fázi exponenciální amplifikace. To lze nejsnáze provést v „log“ zobrazení grafů. Tento krok je třeba opakovat pro každý reportér v cílové směsi.

• Přístroje Applied Biosystems – automatické nastavení prahů v některých situacích nepřináší uspokojivé výsledky. V takových případech je nutné Ct hodnoty určit ručním nastavením prahu. To lze nejsnáze provést v „log“ zobrazení grafů. Tento krok je třeba opakovat pro každý reportér v cílové směsi.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Kritéria validity | | | |
| Reakce | Hodnota FAM™ Ct | Hodnota Cy5 Ct | Hodnota HEX™ (VIC®) Ct |
| Pozitivní kontrola | <38 | <38 | <38 |
| PCR  Negativní kontrola | žádný  signál | žádný  signál | >36 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 8 Interpretace výsledků | | | | |
| Výsledek testu vzorku |  | | | Další charakteristiky |
| DNA PCV2 detekována  DNA PCV3  detekována | <40  N/A | N/A  <40 | Ano/Ne | Pozitivní Ct hodnota a charakteristická křivka amplifikace v porovnání s PCR negativní kontrolou.  Očekává se amplifikační křivka interní kontroly v kanále HEX (VIC); u některých silně PCV2- nebo PCV3-pozitivních vzorků DNA může dojít k negativnímu výsledku interní kontroly.† |
| DNA PCV2 a PCV3 nedetekována | ≥40 | ≥40 | Ano | Amplifikační křivka v kanále interní kontroly HEX (VIC) a pozitivní hodnota Ct. |
| Neplatné‡ | ≥40 | ≥40 | Ne |  |

†Cílová směs je optimalizována pro detekci DNA PCV2 a PCV3; silně pozitivní vzorek DNA může vést k potlačení detekce interní kontroly.

‡ Neplatný vzorek může poukazovat na nesprávnou aplikaci, extrakci a/nebo PCR vzorku. DNA by měla být pětinásobně zředěna vodou PCR Grade Water a opětovně testována; jako vzor je třeba zahrnout neředěnou DNA. Pokud je test stále neplatný, doporučujeme provést novou extrakci.

Příprava standardních křivek a kvantifikace

Za účelem kvantifikace výsledků testu PCR je možné k vytvoření standardní křivky pokrývající škálu testu použít sérii 10násobných ředění připravených ve vodě PCR Grade Water. Standardní křivku je možné použít k přímé kvantifikaci PCV2 nebo PCV3 v extrahovaném vzorku.

Příprava standardních křivek – připravte 10násobná ředění každého kvantifikačního standardu. Příklad: ředění 1:10 se připraví přidáním 10 µl neředěného kvantifikačního standardu do 90 µl vody PCR Grade Water a dobře se rozmíchá. Ředění 1:100 se připraví přidáním 10 µl ředění 1:10 do 90 µl vody PCR Grade Water. Další ředění se připraví analogicky. Ředění by měla být testována v jedné nebo ve dvou jamkách jako vzorky v příslušném testu RealPCR (5 µl/jamku). K dispozici je dostatečný objem každého kvantifikačního standardu k patnáctinásobnému testování standardní křivky (za předpokladu, že jsou připravena 10násobná ředění s použitím 10 µl zásobního roztoku a každé ředění je testováno v jedné jamce).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Očekávané výsledky pro standardní křivky | | |
| Ředění | PCV2 nebo PCV3 (kopií/ml) | Očekávaný výsledek RealPCR |
| Neředěný | 1 x 109 | Pozitivní |
| 1:10 | 1 x 108 | Pozitivní |
| 1:100 | 1 x 107 | Pozitivní |
| 1:1 000 | 1 x 106 | Pozitivní |
| 1:10 000 | 1 x 105 | Pozitivní |
| 1:100 000 | 1 x 104 | Pozitivní |

Výpočet standardní křivky – po detekci cílů v každém 10násobném ředění se vytvoří standardní křivka vynesením hodnoty Ct každého ředění proti logaritmu vzorové koncentrace (kopií/ml). Tato funkce je k dispozici ve většině softwarových balíčků přístrojů pro provádění PCR v reálném čase.

Kvantifikace koncentrace PCV2 a PCV3 ve vzorcích – při použití kvantifikačního softwaru přístroje na provádění PCR v reálném čase bude k výpočtu koncentrace DNA v extraktu (kopií PCV2 nebo PCV3/ml) použita standardní křivka. Koncentrace DNA ve vzorku se vypočítá podle tohoto vzorce:

SC = X \* (EV \* SV)

* SC, koncentrace DNA ve vzorku (kopií PCV2 nebo PCV3/ml)
* X, koncentrace DNA v extraktu (kopií PCV2 nebo PCV3/ml)
* EV, eluční objem použitý při extrakci (µl), např. 100 µl
* SV, objem vzorku použitý při extrakci (µl), např. 200 µl

Pro přesný výpočet konečné koncentrace DNA PCV2 nebo PCV3 ve vzorku je třeba zohlednit jakýkoli další krok týkající se ředění nebo koncentrace, který byl při testování vzorku proveden.

S výpočtem standardní křivky PCV2 a PCV3 a kvantifikací výsledků PCR testů vám mohou poradit pracovníci technické podpory společnosti IDEXX.

Syntetická DNA použitá ve standardech PCV2 DNA QS a PCV3 DNA QS obsahuje signaturu QS Tag (unikátní sekvence oligonukleotidů). Přítomnost signatury QS Tag v pracovním prostředí poukazuje na kontaminaci látkami PCV2 DNA QS a/nebo PCV3 DNA QS. Laboratoře, které chtějí monitorovat kontaminaci PCV2 DNA QS a/nebo PCV3 DNA QS, mohou signaturu QS Tag detekovat pomocí směsí RealPCR Quantification Standards Tracker Mix (99-56740) a RealPCR DNA MMx.

Odbornou pomoc získáte zde:

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 nebo +1 207 556 4895 IDEXX Europe Tel: +800 727 43399

Obraťte se na oblastního manažera nebo distributora IDEXX nebo navštivte naši webovou stránku: idexx.com/contactlpd

\*IDEXX, RealPCR a Test With Confidence jsou ochranné známky nebo registrované ochranné známky společnosti IDEXX Laboratories, Inc. nebo jejích obchodních poboček v USA a/nebo dalších zemích. Všechny další produkty a názvy a loga společností jsou ochrannými známkami svých držitelů.

Barviva, která jsou součástí tohoto produktu, jsou prodávána na základě licence společnosti Biosearch Technologies, Inc. a jsou chráněna patenty USA a mezinárodními patenty, ať už byly vydány nebo je o ně zažádáno. Tato licence se vztahuje na veterinární a humánní aplikace, omezené na výzkum a vývoj a na diagnostické použití.

Informace o patentu: idexx.com/patents

© 2023 IDEXX Laboratories, Inc. Všechna práva vyhrazena.

**Popis symbolů**

|  |  |
| --- | --- |
|  | Číslo šarže |
|  | Sériové číslo |
|  | Katalogové číslo |
|  | Diagnostika in vitro |
|  | Autorizovaný zástupce v Evropském společenství |
|  | Pozitivní kontrolní vzorek |
|  | Negativní kontrolní vzorek |
|  | Použijte do |
|  | Datum výroby |
|  | Výrobce |
|  | Teplotní limity |
|  | Čtěte návod na použití |
|  | Důležitá změna v pokynech pro uživatele |

IDEXX Laboratories, Inc.

One IDEXX Drive

Westbrook, Maine 04092

USA

Výrobce a držitel rozhodnutí o schválení:

IDEXX Montpellier SAS

326 rue de la Galéra

34090 Montpellier

Francie

Zástupce pro EU

IDEXX B.V.

P.O. Box 1334

2130 EK Hoofddorp

Nizozemsko

Idexx.com