Souprava VetMAX Porcine Parvovirus

TaqMan PCR v reálném čase pro detekci prasečího parvoviru

**Katalogové číslo** PPVP50

**Publikace č.** MAN0008855 **Rev**. B.0

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Technologie** | **Druhy** | **Nukleová kyselina izolovaná z matric** | **Typ testu** |
|  |  | Sérum, plazma |  |
| PCR v reálném čase (DNA) |  | Plodová voda |  |
| * Duplexní
 | Prase | Orgány | Individuální |
| * Endogenní IPC
 |  | Sperma |  |
|  |  | Buněčné kultury |  |

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| C:\Users\uzivatel\AppData\Local\Temp\FineReader11.00\media\image1.jpeg | **VAROVÁNÍ!** Přečtěte si bezpečnostní listy (SDS) a dodržujte pokyny k manipulaci. Používejte vhodné ochranné brýle, oděv a rukavice. Bezpečnostní listy (BL) jsou k dispozici na adrese **thermofisher.com/support.** |
|  |  |
| C:\Users\uzivatel\AppData\Local\Temp\FineReader11.00\media\image1.jpeg | **VAROVÁNÍ! POTENCIÁLNÍ BIOLOGICKÉ NEBEZPEČÍ**. Přečtěte si bezpečnostní informace o biologickém nebezpečí na stránce daného výrobku na adrese **termofisher.com**. Používejte vhodné ochranné brýle, oděv a rukavice. |

**Informace o výrobku**

**Popis výrobku**

**Souprava Applied Biosystems™ VetMAX Porcine Parvovirus** je molekulárně diagnostický nástroj pro detekci prasečího parvoviru (PPV) pomocí PCR v reálném čase.

Každý vzorek DNA získaný po extrakci je analyzován v jedné jamce: stejná jamka je použita ke specifické detekci virové DNA viru PPV a IPC (Internal Positive Control) (Interní pozitivní kontroly). Pozitivní IPC odráží účinnost extrakce i nepřítomnost inhibitoru ve vzorcích.

Může se použít na virovou DNA extrahovanou ze **séra, plazmy, plodové vody, orgánů, spermatu a buněčných kultur**.

Kompletní protokoly pro extrakci virové DNA z těchto matric jsou k dispozici na vyžádání od Technické podpory.

**Obsah soupravy a skladování**

**Souprava VetMAX** **Porcine Parvovirus s**e dodává v sadě obsahující složky pro duplexní detekci PPV a interní kontrolu (IPC). Po převzetí musí být celá souprava uložena při teplotě **-30 °C až -10 °C**. Po prvním použití složky uložte soupravu podle následujících doporučení:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Složka** | **Popis** | **Objem (50 reakcí)** | **Skladování** |
| **Po obdržení** | **Po prvním použití** |
| 3 - Mix Parvovirus(Zelená zkumavka) | Mix pro TaqMan PCR. Obsahuje:* Detekční systém pro cílovou strukturu PPV, včetně sondy TaqMan nesoucí označení **FAM - NFQ** (nefluorescenční zhášeč).
* Detekční systém pro IPC, včetně sondy TaqMan nesoucí označení **VIC - TAMRA.**
* Pufr a enzym pro PCR v reálném čase.
 | 2 x 500 μl | -30°C až -10°C | 2 až 8 °C |
| 4a - EPC Parvovirus(Hnědá zkumavka) | **External Positive Control (Externí pozitivní kontrola):**PPV pozitivní kontrola. Sestává z **již extrahované** nukleové kyseliny, která má být amplifikována během PCR v reálném čase. | 90 μl | -30°C až -10°C | -30°C až -10°C |

**Extrakční a amplifikační kontroly**

**Souprava VetMAX Porcine Parvovirus** obsahuje 1 kontrolu, která umožňuje validovat extrakci a amplifikaci virové DNA.

**4a - EPC Parvovirus: PPV positive control (PPV pozitivní kontrola)**

**Již extrahovaná** pozitivní kontrola, která má být amplifikována během PCR v reálném čase.

Pozitivní výsledek v rámci specifikovaného rozsahu Ct umožňuje validovat amplifikaci cílové struktury PPV pomocí PCR v reálném čase.

Ověření extrakce nukleové kyseliny pro každý vzorek se provádí detekcí **endogenous IPC** (Internal Positive Control) (**endogenní IPC** (Interní pozitivní kontroly)) **přítomné v každém vzorku**.

Pozitivní výsledek IPC s vyhovující hodnotou ve vzorku validuje extrakci tohoto vzorku, ať už pozitivního nebo negativního pro cílový patogen, a tím eliminuje falešně negativní výsledky a ověřuje účinek inhibitoru.

**Pro konfirmaci správné analýzy doporučujeme zahrnout dvě negativní kontroly:**

**NCS: negative extraction control (NCS: negativní extrakční kontrola)**

Tato kontrola sestává ze složek použitých při extrakci bez přidání vzorku (objem vzorku může být nahrazen pufrem použitým při přípravě vzorku nebo vodou bez DNázy/RNázy), které procházejí stejným zpracováním jako vzorky, konkrétně extrakcí nukleových kyselin a následně PCR v reálném čase.

Negativní výsledek pro PPV a endogenní IPC potvrzuje nepřítomnost kontaminace během extrakce a PCR v reálném čase.

**NC: negative amplification control (NC: negativní amplifikační kontrola)**

Jedná se o amplifikační mix, který se nanáší na destičku během přípravy PCR v reálném čase společně s 5 μl vody bez DNázy/RNázy pro doplnění objemu na 25 μl.

Negativní výsledek pro PPV a IPC potvrzuje absenci kontaminace během přípravy PCR reakce v reálném čase.

**Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky**

Pokud není uvedeno jinak, jsou všechny materiály k dispozici na stránce **thermofisher.com**.

* Vysoce přesné mikropipety (rozmezí od 1 μl do 1000 μl) s filtrovanými špičkamibez DNázy/RNázy.
* DNase/RNase-free water (Voda bez DNázy/RNázy)
* 1X TE pufr
* 1X PBS pufr
* Termocykler pro PCR v reálném čase schopný detekovat následující fluorofory:
	+ FAM™ (maximální emise: λ515 nm)
	+ VIC™ (maximální emise: λ554 nm)
* Spotřební materiál potřebné optické kvality kompatibilní s termocyklerem:
	+ 96-jamkové PCR destičky, PCR stripy (8 nebo 12 jamek), mikrozkumavky nebo kapiláry
	+ Vhodné kryty destiček nebo víčka pro zakrytí

**Postup analýzy**

Reakční objem PCR v reálném čase je 25 μl:

* **3 - Mix Parvovirus**: 20 μl na analýzu
* **Extrahovaná** **DNA**: 5 μl na analýzu

**Extrakce virové DNA**

DNA musí být izolována ze vzorků pro analýzu PCR v reálném čase.

**POZNÁMKA**: Pro informace o kompatibilních a validovaných metodách extrakce, které jsou kompatibilní se soupravou VetMAX™ Porcine Parvovirus a které jsou pro ni validovány, kontaktujte oddělení technické podpory.

**Příprava PCR v reálném čase**

1. Vytvořte plán analýzy pro distribuci mixů a vzorků. Je-li to možné, uchovávejte pozitivní kontrolu (EPC) odděleně od ostatních vzorků.
2. Rozmrazte zkumavku s reagencií **3 - Mix Parvovirus** při teplotě mezi **2 °C a 8 °C**, na ledu nebo v chlazeném stojanu.
3. Zkumavku s reagencií **3 - Mix Parvovirus** promíchejte opatrným protřepáním a poté krátce centrifugujte.
4. Do každé použité jamky PCR destičky, PCR stripu nebo kapiláry přidejte po 20 μl reagencie **3 - Mix Parvovirus**.
5. Přidejte DNA ze vzorků a kontrol do reakčního mixu podle následujícího předem nastaveného plánu analýzy:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Typ analýzy** | **Složka** | **Objem vzorku** |
| Vzorek pro analýzu | DNA extrahovaná ze vzorku | 5 μl |
| Positive amplification control (Pozitivní amplifikační kontrola) | **4a - EPC Parvovirus** | 5 μl |
| Negative extraction control (Negativní extrakční kontrola) (NCS) | Extrahovaná NCS | 5 μl |
| Negative amplification control Negativní amplifikační kontrola (NC) | DNase/RNase-free water (Voda bez DNázy/RNázy) | 5 μl |

1. Zakryjte PCR destičku, PCR stripy nebo kapiláry adhezivním víčkem destičky nebo vhodnými uzávěry.

**Amplifikace pomocí PCR v reálném čase**

1. Na termocykleru vytvořte následující detektory:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Reportér** | **Quencher** |
| PPV | FAM | NFQ (nefluorescenční zhášeč) |
| IPC PPV | VIC™ | TAMRA(1) |
| Pasivní reference: ROX(1) |

(1) Fluorofory TAMRA a ROX jsou zapotřebí pro analýzu PCR v reálném čase, pokud je termocykler schopen je detekovat. U ostatních termocyklerů absence schopnosti detekovat tyto fluorofory nezhoršuje analýzu PCR v reálném čase.

1. Přiřaďte **PPV** detektor a **IPC PPV** detektor ke každé jamce se vzorkem použité v analýze.
2. Pro analýzu nastavte následující program PCR v reálném čase:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Opakování kroků** | **Teplota** | **Doba trvání** |
| Krok 1 | x1 | 50 °C | 2 minuty |
| Krok 2 | x1 | 95 °C | 10 minut |
| Krok 3 | x40 | 95 °C | 15 sekund |
| 60 °C(1) | 1 minuta |

(1) Sběr dat fluorescence během jednominutové fáze při teplotě 60 °C.

1. Vložte PCR destičku, PCR stripy nebo kapiláry do termocykleru a spusťte PCR v reálném čase.

**Analýza výsledků**

**Analýza surových dat**

Pro analýzu surových dat postupujte podle doporučení výrobce termocykléru.

1. Prahové limity nastavte odděleně pro každý cíl PCR v reálném čase.
2. Pro každý detektor interpretujte výsledky podle hodnot Ct vzorku získaných podle doporučení níže.

**Validace**

Validace testu je akceptována, pokud jsou splněna následující kritéria:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **PPV detektor** | **IPC PPV detektor** | **Validace** |
| EPC PPV | Ct = Ct QC PPV **4a - EPC Parvovirus** ± 3Ct(1) | Ct < 40 nebo Ct > 40(2) | Validováno pro PCR |
| NCS | Ct > 40 | Ct > 40 | Validováno pro extrakci |
| NC | Ct > 40 | Ct > 40 | PCR složky validovány |

(1) Viz hodnoty uvedené v oddílu 2.1 „EPC“, certifikátu o analýze šarže použité pro daný test.

2) Hodnota IPC v EPC by se neměla použít k validaci testu.

**Interpretace výsledků**

Pro každý analyzovaný vzorek by měly být výsledky interpretovány takto:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **PPV detektor** | **IPC PPV detektor** | **Interpretace** |
| Ct < 40 | Ct < 40 nebo Ct > 40 | PPV detekován |
| Ct > 40 | Ct < 40 | PPV nedetekován |
| Ct > 40 | Ct > 40 | Nevalidováno(1) |

(1) Vzorek bude vrácen jako nevalidovaný z důvodu negativní IPC.

**Postup pro zacházení s nevalidovanými vzorky**

1. Nevalidovaný vzorek DNA nařeďte v poměru 1 : 10 v 1X TE pufru.
2. Proveďte novou PCR analýzu na 5 μl tohoto ředění.
3. Pokud je zředěná DNA pozitivní nebo negativní na PPV s vyhovujícím výsledkem IPC, je získaný výsledek validován.
4. Pokud je zředěná DNA negativní na PPV a současně je nevyhovující výsledek IPC, získaný výsledek stále není validován. V takovém případě opakujte extrakci nukleové kyseliny za použití vzorku, který je před extrakcí předem naředěn 1 : 10 v 1X PBS pufru.
5. Pokud výsledek stále není validován, opakujte analýzu na novém vzorku.