**Souprava VetMAX Porcine PCV2 Quant Kit**

TaqMan PCR v reálném čase pro detekci prasečího cirkoviru typu 2

**Katalogové číslo** QPCV

**Publikace č.** MAN0009437 **Rev**. C.0

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Technologie** | **Druhy** | **Nukleová kyselina izolovaná z matric** | **Typ testu** |
| PCR v reálném čase (DNA) |  |  |  |
| * Duplexní | Prase | Plná krev, sérum, orgány, orální tekutina, nosní výtěry | Individuální |
| * Exogenní IPC |  |  |  |

|  |  |
| --- | --- |
| 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 PCV2 Quant** je molekulárně diagnostický nástroj, který umožňuje detekci prasečího cirkoviru typu 2 (PCV2), tj. DNA viru klasifikovaného do rodu C*ircovirus* z čeledi Circoviridae. Tento virus je v současnosti uznáván jako hlavní infekční agens podílející se na vývoji multisystémového chřadnutí selat po odstavu (PMWS).

Každý vzorek DNA získaný po extrakci je analyzován v jedné jamce: stejná jamka je použita ke specifické detekci virové DNA viru PCV2 a IPC (Internal Positive Control) (Interní pozitivní kontroly). Pozitivní IPC prokazuje účinnost extrakce a nepřítomnost inhibitoru ve vzorcích. Může být použita na virovou DNA extrahovanou z **plné krve, séra, orgánů, ústních tekutin a nosních výtěrů.**

Kompletní protokoly pro extrakce virové DNA z těchto matric jsou k dispozici na vyžádání na adrese **thermofisher.com/askaquestion**

**Obsah soupravy a skladování**

Souprava **VetMAXPorcine PCV2 Quant** se dodává v krabici obsahující různé reagencie pro detekci PCV2 v duplexu a IPC. Po převzetí musí být celá souprava skladována při teplotě **-30 °C až -10 °C.** Po prvním použití složky uložte soupravu podle následujících doporučení:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Složka** | **Popis** | **Objem**  **(100 testů)** | **Skladování** | |
| **Po obdržení** | **Po prvním použití** |
| 3 - Mix  QPCV2  (Zelená zkumavka) | Mix pro TaqMan PCR. Obsahuje:  • Detekční systém pro cílovou strukturu PCV2, 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 1 000 μl | -30 °C až -10 °C | -30 °C až -10 °C |
| 4b - Standard  PC. QPCV2  (Hnědá zkumavka) | **Kvantifikační standard PCV2:**  DNA z plazmy připravená k naředění pro dosažení standardního kvantifikačního rozsahu. Jeho použití umožňuje dosáhnout absolutní kvantifikace neznámého vzorku. | 2 x 50 μl | -30 °C až -10 °C | -30 °C až -10 °C |
| 5 - IPC  QPCV2  (Žlutá zkumavka) | **Internal Positive Control (Interní pozitivní kontrola):**  Exogenní interní kontrola, která se má přidat ke každému vzorku a ke každé kontrole v lyzačním kroku extrakce. | 500 μl | -30 °C až -10 °C | -30 °C až -10 °C |

**POZNÁMKA**: U malých extrakčních sérií se doporučuje rozdělit IPC QPCV2 do alikvotů při prvním použití, aby se zamezilo více než 3 cyklům zmrazování / rozmrazování (v minimálním objemu 50 μl).

**Extrakční a amplifikační kontroly**

**Souprava VetMAX Porcine PCV2 Quant** obsahuje 2 kontroly, které umožňují validovat extrakci a amplifikaci virové DNA:

**4b - Standard PC. QPCV2: PCV2 positive control (QPCV2: PCV2 pozitivní kontrola)**

**Již extrahovaná** pozitivní kontrola kvantifikovaná na 1,0 x 1010 kopií/ml, pro zředění rozsahu. Naředění standardu rozsahu a následná amplifikace tohoto rozsahu během PCR v reálném čase umožňuje kvantifikaci vzorků. Pro kvalitativní aplikaci amplifikujte pouze koncový bod rozsahu ředění (podle doporučení v protokolu).

Pozitivní výsledek v rámci specifikovaného rozsahu Ct umožňuje validovat amplifikaci cílové struktury PCV2 pomocí PCR v reálném čase.

**5 - IPC QPCV2: internal positive control (interní pozitivní kontrola)**

Pozitivní kontrola se **přidává ke každému vzorku v lyzačním kroku** extrakce nukleové kyseliny.

Pozitivní výsledek IPC s hodnotou v mezích přijatelného rozsahu Ct u vzorku validuje extrakci tohoto vzorku, ať už pozitivního nebo negativního pro cílový patogen: eliminace falešně negativních výsledků a ověření účinku inhibitoru.

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

**NCS: negative control sample (NCS: negativní kontrolní vzorek)**

Tato kontrola je složena z reagencií 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: extrakcí nukleových kyselin (s přídavkem IPC) a PCR v reálném čase. Negativní výsledek pro PCV2 umožňuje validovat nepřítomnost kontaminace během extrakce a PCR v reálném čase.

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

Jedná se o amplifikační mix, který se přidává 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 PCV2 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: A515 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 QPCV2**: 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.

Přidejte **5 μl** reagencie 5 - **IPC QPCV2** ke každému vzorku, který má být extrahován, a do NCS, v lyzačním kroku extrakce nukleové kyseliny.

**POZNÁMKA**: Pro informace o metodách extrakce, které jsou kompatibilní se soupravou VetMAX Porcine PCV2 Quant a které jsou pro ni validovány, kontaktujte naše pracoviště na adrese **thermofisher.com/askaquestion**.

**Příprava standardní křivky**

Při provádění tohoto kroku přijměte příslušná bezpečnostní opatření, aby nedošlo ke kontaminaci PCR 3 v reálném čase - Mixu QPCV2.

1. Sériově nařeďte DNA ze **4b - Standard PC. QPCV2** na 1 : 10, přednostně v 1X TE pufru pro lepší skladování (nebo s vodou bez DNázy / RNázy) pro vytvoření 7 bodů dosahu na standardní křivce:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Bod dosahu** | **Koncentrace** | **Nastavení bodů dosahu** |
| Bod 1 (Standard PC. QPCV2) | 1,0 x 1010 kopií/ml | **4b - Standard PC. QPCV2** |
| Body 2 (Standard PC. QPCV2 10-1) | 1,0 x 109 kopií/ml | 10 μl **4b - Standard PC. QPCV2** + 90 μl 1X TE |
| Bod 3 (Standard PC. QPCV2 10-2) | 1,0 x 108 kopií/ml | 10 μl Standard PC. QPCV2 10-1 + 90 μl 1X TE |
| Bod 4 (Standard PC. QPCV2 10-3) | 1,0 x 107 kopií/mL | 10 μl Standard PC. QPCV2 10-2 + 90 μl 1X TE |
| Bod 5 (Standard PC. QPCV2 10-4) = PC QPCV2(1) | 1.0 x 106 kopií/mL | 10 μl Standard PC. QPCV2 10-3 + 90 μl 1X TE |
| Bod 6 (Standard PC. QPCV2 10-5) | 1,0 x 105 kopií/ml | 10 μl Standard PC. QPCV2 10-4 + 90 μl of 1X TE |
| Bod 7 (Standard PC. QPCV2 10-6) | 1,0 x 104 kopií/ml | 10 μl Standard PC. QPCV2 10-5 + 90 μl 1X TE |
| Faktor sériového ředění: 1:10 | | |

(1) Pro kvalitativní aplikaci není nutné přidávat celý rozsah kvantifikace. Použijte jeden koncový bod ředění pro tento rozsah jako kontrolu amplifikace: PC QPCV2 (= Standard PC. QPCV2 10-4 kvantifikovaný na 1,0 x 106 kopií/ml).

1. Uchovávejte standardy DNA při teplotě nižší než -16 °C v alikvotech alespoň po 30 μl po **celou dobu použitelnosti soupravy**. U standardů DNA se nedoporučuje používat více než 3 cykly zmrazení/rozmrazení.

**Příprava PCR v reálném čase**

1. Vytvořte plán analýzy pro distribuci mixů a vzorků. Je-li to možné, uchovávejte pozitivní kontrolu odděleně od ostatních vzorků.
2. Rozmrazte zkumavku **3 - Mix QPCV2** při teplotě **2 °C až + 8 °C** na ledě nebo v chlazeném stojanu.
3. Promíchejte **3 - Mix QPCV2** opatrným mícháním zkumavky a poté krátce centrifugujte.
4. Přidejte po **20 μl mixu 3 - Mix QPCV2** do každé použité jamky PCR destičky, PCR stripu nebo kapiláry.
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 |
| Rozsah kvantifikace | Ředicí rozsah **4b - Standard PC QPCV2** | 5 μl |
| Pozitivní kontrola(1) | PC QPCV2 (= Standard PC. QPCV2 10-4) | 5 μl |
| Negativní kontrolní vzorky (NCS) | Extrahovaná NCS | 5 μl |
| Negative amplification control Negativní amplifikační kontrola (NC) | DNase/RNase-free water (Voda bez DNázy/RNázy) | 5 μl |

(1) Tento bod nahrazuje rozsah kvantifikace pro kvalitativní aplikace.

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

**Amplifikace pomocí PCR v reálném čase**

1. Na termocykleru nastavte následující detektory:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Cílová struktura** | **Reportér** | **Quencher** |
| QPCV2 | FAM | NFQ (nefluorescenční zhášeč) |
| IPC | VIC | TAMRA (1) |
| Pasivní reference: ROX (1) | | |

(1) Fluorofory TAMRA a ROX musí být zadány 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. Nastavte QPCV2 detektor a IPC 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. Vzhledem k vysoké hodnotě Ct standardu PC. QPCV2, může být automatické nastavení základní hodnoty nesprávné. Pokud je to nutné, nastavte základní linii manuálně na 2-3 Ct před první amplifikací.
2. Prahové limity nastavte odděleně pro každý cíl PCR v reálném čase.
3. Pro každý detektor interpretujte výsledky podle hodnot Ct vzorku získaných podle doporučení níže.

**Validace**

**Validace kvalitativních testů**

Test je validován, pokud jsou splněna následující akceptační kritéria:

1. Hodnota Ct pro cíl QPCV2 v pozitivní kontrole (PC QPCV2) musí být v certifikátu o analýze ± 3 Ct hodnoty Ct pozitivní kontroly.
2. Hodnota Ct pro IPC v negativním kontrolním vzorku (NCS) musí být ± 3 Ct hodnoty Ct IPC v certifikátu o analýze.
3. V negativní amplifikační kontrole (NC) není vidět žádná amplifikace.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Kritéria** | **Kontrolní sérum** | **QPCV2 detektor** | **IPC detektor** | **Validace** |
| a | PC QPCV2  (pozitivní kontrola) | Ct = Ct QC QPCV2  Standard PC. QPCV2 10-4 ± 3 Ct(1) | Ct < 40 nebo Ct > 40(2) | Validováno pro PCR |
| b | NCS | Ct > 40 | Ct = Ct QC IPC  **5 - IPC QPCV2** ± 3 Ct(3) | Validováno pro extrakci |
| c | NC | Ct > 40 | Ct > 40 | Validované PCR složky |

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

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

(3) Viz hodnoty uvedené v oddílu 2.2 „IPC“, certifikátu o analýze šarže použité pro daný test.

**Další validační kritéria pro kvantitativní testy**

Pomocí programu PCR v reálném čase nastavte kvantifikační hodnoty (kopie/ml) pro každý bod dosahu na standardní křivce. Kromě kvalitativní validace testu je standardní křivka validována, jsou-li splněna následující kritéria:

|  |  |
| --- | --- |
| **Parametr** | **Validační kritéria** |
| Standardní křivka | Hodnota Ct pro cíl QPCV2 každém bodu dosahu: Ct = Ct QC QPCV2 **4b - Standard PC. QPCV2** ±3 Ct(1) |
| Účinnost PCR | 85-115 % (sklon -3.743 až -3.008) |

(1) Viz odpovídající bod dosahu uvedený v oddílu 2.1 „Standardu“, certifikátu o analýze šarže použité pro daný test.

**Interpretace výsledků**

**Kvalitativní aplikace**

U každého analyzovaného vzorku interpretujte výsledky podle pokynu:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **QPCV2 detektor** | **IPC detektor** | **Interpretace pro krev, sérum, orgány** | **Interpretace pro orální tekutiny, nosní výtěry** |
| Ct < 37 | Ct < 40 nebo Ct > 40 | PCV2 detekován | PCV2 detekován |
| 37 < Ct < 40 | Ct <40 nebo Ct > 40 | PCV2 detekován | Suspektní výsledek(1) |
| Ct > 40 | Ct ≤ Ct IPC NCS + 3 Ct (2) | PCV2 nedetekován | PCV2 nedetekován |
| Ct > 40 | Ct > Ct IPC NCS + 3 Ct (2) | Neplatný výsledek(3) | Neplatný výsledek(3) |

(1) U orálních tekutin a nosních výtěrů se za suspektní výsledek považuje hodnota Ct > 37, která odpovídá limitu detekce PCR. Doporučujeme zopakovat PCR v reálném čase.

(2) Viz hodnota IPC Ct získaná pro NCS připravený během stejné extrakční série jako vzorky, které mají být analyzovány. Hodnota IPC Ct získaná pro tento NCS musí být nejprve validována, jak je popsáno výše.

(3) Výsledek bude považován za neplatný z důvodu nevyhovující hodnoty IPC.

**Kvantitativní aplikace**

**Výpočet koncentrace extraktu DNA**

1. Ověřte, zda jsou validovány NCS, NC a standardní křivka.
2. Zjistěte, zda jsou neznámé vzorky kvantifikovatelné:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **IPC detektor** | **QPCV2 detektor** | **Interpretace** | **Opatření** |
| Ct ≤ Ct IPC NCS + 3 Ct | Ct spadá mezi Ct bodu 1 a Ct bodu 7 na standardní křivce | Kvantifikovatelný vzorek | Přejděte ke kroku 4. |
| Ct je nižší než Ct bodu 1 standardní křivky | Nekvantifikovatelný vzorek | Vykažte jako detekovatelný, ale mimo rozsah kvantifikace. |
| Ct je vyšší než Ct bodu 7 standardní křivky | Nekvantifikovatelný vzorek |
| Ct > Ct IPC NCS + 3 Ct | Libovolná hodnota | Neplatný výsledek | Zřeďte vzorek DNA v poměru 1 : 10 v 1X TE a proveďte novou analýzu PCR na 5 μl tohoto ředění.  Vzorek je kvantifikovatelný, pokud:  Ct ≤ Ct IPC NCS + 6 Ct |

1. U kvantifikovatelných vzorků použijte program PCR v reálném čase pro výpočet cílového množství DNA PCV2 pro každou extrakci za použití standardní křivky.
2. Vypočítejte množství PCV2 na vzorek.

**Kopie PCV2/ml** = kvantifikace PCR (kopie/ml) x [(EV (μl) / TS (μl)]

* EV je eluční objem extrakční metody v μl.
* TS je vstupní objem vzorku při extrakci v μl.

**POZNÁMKA**: Je důležité vzít v úvahu ředicí faktory použité v průběhu procesu. U vzorků orgánů se doporučuje semlít orgány v 1 ml 1X PBS a zpracovat pomocí supernatantu po centrifugaci po dobu 2 minut při 1500 x *g* . Množství PCV2 v kopiích/ml v supernatantu se proto přímo rovná množství PCV2 obsaženého v celém vzorku mletého orgánu.

**Postup pro řešení neplatných výsledků**

1. Nevalidovaný vzorek RNA 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 PCV2 s vyhovujícím výsledkem IPC, je získaný výsledek validován.
4. Pokud je zředěná DNA negativní na PCV2 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.

|  |  |
| --- | --- |
| **Dokumentace a podpora** |  |
| **Zákaznická a technická podpora**  Technická podpora: navštivte **thermofisher.com/askaquestion**  Nejnovější služby a podporu naleznete na adrese **thermofisher.com/support**:   * Mezinárodní kontaktní telefonní čísla * Objednávková a webová podpora * Uživatelské příručky, manuály a protokoly * Osvědčení o analýze * Bezpečnostní listy (BL; známé také jako MSDS)   **POZNÁMKA**: Pokud chcete získat bezpečnostní listy pro chemické látky jiných výrobců, kontaktujte výrobce. |  |
|  |
|
|
|
|