NÁVOD K POUŽITÍ

Veterinární přípravek.

Pouze pro zvířata.

**ID GENE BVDV/BDV TRIPLEX 2.0**

**SOUPRAVA PRO KVALITATIVNÍ DETEKCI RNA VIRŮ BVDV A BDV POMOCÍ RT-PCR V REÁLNÉM ČASE**

|  |  |
| --- | --- |
| PATOGENY | Viry způsobující bovinní virovou diareu (BVDV) a hraniční nemoc (BDV) |
| TYP NUKLEOVÉ KYSELINY | RNA |
| DRUHY | Přežvýkavci |
| CÍLOVÉ SEKVENCE | * **BVDV/BDV RNA:** 5' UTR
* **Endogenní necílová pozitivní kontrola (NTPCen):** Sekvence DNA specifická pro přežvýkavce (všudypřítomný buněčný gen)
* **Exogenní necílová pozitivní kontrola (NTPC-BVDV2):** Sekvence viru RNA
 |
| DRUHY VZORKŮ | * **Ušní zářez** (jednotlivé vzorky nebo skupiny až 25 vzorků)
* **Plná krev, sérum** (jednotlivé vzorky nebo skupiny až 100 vzorků) a mléko (jednotlivé vzorky nebo mléko ve velkém množství)
* **Orgán** (slezina, jednotlivé vzorky)
 |
| SOUVISEJÍCÍ PRODUKTY | * Souprava pro rychlou magnetickou extrakci ID Gene (kód výrobku: MAGFAST384)
* Souprava pro magnetickou univerzální extrakci ID Gene (kód výrobku: MAG192/MAG384)
* Souprava pro univerzální odstředivou extrakci ID Gene (kód výrobku: SPIN50/SPIN250)
* Pozitivní extrakční kontrola BVDV (kód výrobku: PEC-BVDV)
* Snadná příprava pro vzorky z ušních zářezů ID Gene 2.0 (kód výrobku: EZNOTCHV2)
 |
| KÓDY A FORMÁTY VÝROBKŮ | **IDBVDV2-50**50 testů  | **IDBVDV2-100**100 testů  |

Použití *in vitro*

|  |
| --- |
| **RIZIKA A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PŘI POUŽITÍ** |
| Před použitím si pečlivě přečtěte tento návod. Pro každou šarži soupravy použijte pouze verzi návodu k použití uvedený na listu pro kontrolu kvality. Varování: Některé komponenty obsahují nebezpečné chemické látky. Používejte ochranné rukavice/oděv/brýle. Dodržujte správnou laboratorní praxi (SLP) a bezpečnostní pokyny. Likvidujte činidla a biologický odpad v souladu s platnými místními právními předpisy. Obecná příručka k používání technik molekulární biologie a bezpečnostní listy (BL) jsou k dispozici na vyžádání na adrese **info@innovative-diagnostics.com.** |
| **OBECNÉ INFORMACE** |
| **Vlastnosti**Souprava ID Gene BVDV/BDV Triplex 2.0 (IDBVDV2) je určena pro kvalitativní Triplex detekci, je ihned připravena k použití a detekuje současně v reálném čase:* **Cílovou sekvenci specifickou pro pestiviry přežvýkavců (BVDV/BDV)** zodpovědné za bovinní virovou diareu a hraniční nemoc v kanálu FAM.
* **Specifickou sekvenci všudypřítomného genu**, který je přirozeně přítomen v **buňkách přežvýkavců (NTPCen**), za účelem ověření integrity vzorku a kvality extrakce nukleové kyseliny v **kanálu VIC/ HEX**.
* **Specifickou sekvenci exogenní necílové pozitivní kontroly (NTPC-BVDV2)** přidávanou ke všem vzorkům před extrakcí pro ověření kvality extrakce a posouzení přítomnosti inhibitorů RT-qPCR, v **kanálu Cy5**.

Tuto soupravu lze použít na následujících matricích: |
| POVAHA VZORKU | INDIVIDUÁLNÍ ANALÝZA | SOUHRNNÁ ANALÝZA |
| Plná krev | Možné | Možné až do 100 |
| Sérum\* | Možné | Možné až do 100 |
| Orgán (slezina) | Možné | V případě potřeby nás kontaktujte |
| Ušní zářez\*/\*\* | Možné | Možné až do 25 |
| Mléko | Možné | Nádrž |

\* *Matrice validované francouzskou Národní referenční laboratoří (NRL) pro BVD (ANSES-Niort).*

\*\* *Zpracování ušních zářezů pro extrakci nukleových kyselin bez purifikace lze dosáhnout rychlou přímou lýzou pomocí soupravy snadné přípravy pro odběr vzorků z ušních zářezů ID Gene 2.0 (EZNOTCHV2).*

**Složení soupravy, příprava činidel a podmínky skladování**

Souprava ID Gene BVDV/BDV Triplex 2.0 obsahuje níže uvedená činidla:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| REF. ČÍSLO | OBJEM | POPIS | TEPLOTA A DOBA KONZERVACE | PŘÍPRAVA ČINIDEL |
| PŘI PŘÍJMU | PO REKONSTITUCI |
| **NTPC-BVDV2**Exogennínecílovápozitivní kontrola | 1 lahvička s lyofilizovaným obsahem2 200 µl | **RNA virus** | ≤ – 16 °C**Sušené mrazem:**řiďte se datem použitelnosti uvedeným na lahvičce. | ≤ – 16 °Cuchovávejte po dobu nejvýše 12 měsíců (1) | Přidejte 2 200 µl vody bez nukleázy (bez RNázy/DNázy). Nechte je resuspendovat po dobu 10 minut při pokojové teplotě a poté je promíchejte. Před použitím zkontrolujte, zda se pelety zcela rozpustily. |
| **ARM-BVDV2**Amplifikačníreakčnísměs | Mikrozkumavka, bílý uzávěr400 µlx1: 50 testů x2: 100 testů  | **Reakční směs**obsahuje reverzní transkriptázu, Taq polymerázu, primery, hydrolýzní sondy a oligonukleotidy. | Skladujte při≤ – 16 °C,chráněné před světlem. | NEUPLATŇUJE SE (1) | Připraveno k použití. |
| **PAC-BVDV**Pozitivníamplifikačníkontrola | Mikrozkumavka, modrý uzávěr100 µl | **Syntetické nukleové kyseliny specifické pro BVDV** | Skladujte při≤ – 16 °C | NEUPLATŇUJE SE (1) | Připraveno k použití. |

|  |
| --- |
| **(1) Pro všechna činidla se doporučuje připravit alikvoty (minimálně 100 µl), aby se zabránilo více než 3 cyklům zmrazení/rozmrazení na alikvot. Rozmrazte alikvot nejlépe při teplotě 5 °C (± 3 °C) nebo při pokojové teplotě (21 °C ± 5 °C), pokud jej použijete ihned po rozmrazení.** |

**Nezbytné materiály, které nejsou součástí soupravy**

Veškerý použitý materiál by měl být v kvalitě vhodné pro molekulární biologii.

**Přístroje:**

* Termocykler PCR v reálném čase s kanály pro snímání těchto fluoroforů: FAM, HEX nebo VIC a Cyanine 5 (Cy5).

**Vybavení, spotřební materiál a činidla:**

* Přesné pipety pro dávkování objemů od 1 do 1 000 µl.
* Hroty bez nukleázy s filtry.
* 96jamkové PCR destičky, proužky nebo PCR mikrozkumavky (s optickou kvalitou kompatibilní s termocyklerem) a vhodné lepicí fólie nebo víčka.
* Voda s molekulárně biologickou kvalitou (např. voda bez nukleázy)
* Chladicí regál.

|  |
| --- |
| **KONTROLY EXTRAKCE A AMPLIFIKACE** |

Pro každé kolo analýzy se důrazně doporučuje použít následující kontroly:

|  |  |
| --- | --- |
| **KONTROLA** | **POPIS** |
| Je třeba dosáhnout | **NAC**Negativníamplifikačníkontrola | Tato kontrola (voda bez nukleázy) se používá k ověření nepřítomnosti kontaminantů během amplifikace RT-qPCR. Může být zahrnuta do každého cyklu. |
| **NEC**Negativníextrakčníkontrola | Tato kontrola, s níž se zachází **stejně jako se vzorky z fáze předúpravy (je-li to nutné),** může sestávat z:* **Vody bez nukleázy** (RNase /DNase free) nebo **jakéhokoli jiného pufru** použitého během extrakčního kroku **(proces NEC)**. Tato kontrola se používá k ověření **nepřítomnosti kontaminace** během **extrakčního kroku.**
* **nebo negativní matrice** odpovídající matrici testovaného vzorku **(matrice NEC)**. Tato kontrola umožňuje **posoudit kvalitu předúpravy a extrakce, ověřit nepřítomnost kontaminace a může být použita jako reference** pro **analýzu exogenních signálů** ze **vzorků**.

**Tato kontrola by neměla obsahovat cílový patogen.** |
| Dodává se s touto soupravou | **PAC-BVDV**Pozitivníamplifikačníkontrola | Tato kontrola umožňuje ověřit amplifikaci cíle. Skládá se ze syntetické cílové nukleové kyseliny.*Poznámka: Pokud se již jako pozitivní kontrola pro testovací běhy používá PEC-BVDV nebo interní kontrolní vzorek, není použití PAC-BVDV povinné* |
| **NTPC-BVDV2**Exogenní necílová pozitivní kontrola | Jedná se o lyofilizovanou necílovou pozitivní kontrolu, která se skládá z RNA viru, jenž funguje jako napodobenina cílového viru. **Přidává se ve fázi předúpravy pro extrakci** ke **všem vzorkům včetně kontrol** (PEC-BVD a NEC).Poskytuje exogenní signál k posouzení **účinnosti předúpravy a extrakce a k identifikaci možné přítomnosti inhibitorů v každém vzorku.** |
| Dodává se samostatně | **PEC-BVDV**Pozitivníextrakčníkontrola | Jedná se o lyofilizovanou pozitivní kontrolu, která se skládá z kmene BVDV zředěného v negativním séru. Používá se k hodnocení kvality **předúpravy, extrakce** a **amplifikace RT-qPCR**. **Před běžným použitím určete vhodný faktor ředění**. Informace o rekonstituci a skladování naleznete v příbalové informaci.Tuto kontrolu lze nahradit testem TPC-EN-BVD v testech, které zahrnují vzorky z ušních zářezů. |
| K dispozici samostatně nebo se soupravou pro rychlou přímou lýzu **ID Gene****Snadná příprava vzorků ušních zářezů 2.0 (EZNOTCHV2)** | **TPC-EN-BVD**Cílová pozitivní kontrola pro vzorek z ušního zářezu | Jedná se o lyofilizovanou pozitivní kontrolu, která se skládá z pozitivního střepu BVDV, zředěného v negativním střepu, kalibrovaného v rozmezí 10 až 100násobku detekčního limitu metody.**Tato kontrola se používá místo PEC-BVD pro předúpravu a extrakci vzorků z ušních zářezů.****TPC-EN-BVD** lze **použít** jako **sentinel** pro sledování analytické citlivosti. |
| **NTPC-EN-BVDV2**Exogenní necílová pozitivní kontrola pro ušní zářezy | Jedná se o lyofilizovanou necílovou pozitivní kontrolu sestávající z RNA viru, který funguje jako napodobenina cílového viru a je speciálně kalibrován pro metodu rychlé přímé lýzy. **Přidává se do** **všech vzorků včetně kontrol** (TPC-EN-BVD a NEC) ve **fázi před úpravou pro extrakci**. Poskytuje exogenní signál k **posouzení účinnosti předúpravy a extrakce a k identifikaci přítomnosti inhibitorů v každém vzorku z ušního zářezu**. |
| Vlastní vzorky a kontroly extrakce | **NTPCen**Endogenní necílová pozitivní kontrola | Tato necílová pozitivní kontrola je **přirozeně přítomna v buňkách přežvýkavců**. Používá se k ověření lýzy buněk a **amplifikace necílového genu pomocí RT-qPCR**.**Potvrzuje přítomnost** **buněk** a může poskytnout informaci o **stavu vzorku**. |

|  |
| --- |
| **EXTRAKCE NUKLEOVÝCH KYSELIN** |

Tato souprava byla validována pro následující extrakční metody:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| POPIS | NÁZEV VÝROBKU | KÓD VÝROBKU |
| Souprava pro rychlou přímou lýzu vzorku z ušního zářezu | Souprava pro snadnou přípravu vzorků z ušních zářezů ID Gene 2.0 | EZNOTCHV2 |
| Souprava pro extrakci nukleových kyselin s magnetickými kuličkami | Univerzální magnetická extrakční sada ID Gene | MAG192/MAG384 |
| Souprava pro rychlou extrakci ID Gene Mag | MAGFAST384 |
| Souprava pro extrakci nukleových kyselin s kolonami | Univerzální odstředivá extrakční souprava ID Gene | SPIN50/SPIN250 |

**Protokoly o předúpravě a extrakci vzorků a kontrol pro tyto extrakční soupravy jsou k dispozici na vyžádání na adrese**

**info@innovative-diagnostics.com.**

|  |
| --- |
| **Důležité upozornění** |
| **Ačkoli qPCR testy z řady produktů IDvet lze použít s extrakčními soupravami od jiných dodavatelů, je důležité nás kontaktovat PŘED provedením testů, abychom ověřili kompatibilitu.** |

Testovací objemy pro extrakci kontrol jsou uvedeny v tabulce níže.

|  |  |
| --- | --- |
| KONTROLA | OBJEM |
| PEC-BVDV | 50 µl |
| TPC-EN-BVD | 50 µl |
| NTPC-(EN)-BVDV2 | **Ke každému vzorku,** **NEC, PEC-BVDV a TPC-EN-BVD přidejte** 20 µl |

|  |
| --- |
| **Důležité upozornění** |
| Při použití extrakční soupravy nebo přímé extrakce lýzou **přidejte do** mikrozkumavek nebo destiček Deepwell **nejprve** **vzorky/kontroly extrakce, poté lyzační pufr a nakonec 20 µl NTPC-(EN)-BVDV2. Nepřidávejte NTPC-(EN)-BVDV2 přímo ke kontrolnímu vzorku/extrakci**. Pokud se má analyzovat velký počet vzorků, doporučuje se připravit homogenní směs lyzačního pufru a NTPC vynásobením uvedených množství počtem analyzovaných vzorků a kontrol a přidáním mrtvého objemu 10 %. |

|  |
| --- |
| **PROTOKOL AMPLIFIKACE** |

**Příprava amplifikační reakce RT-qPCR**

 *Doporučuje se, aby se depozity prováděly ve vyhrazeném prostoru pod digestoří PCR a aby doba provádění depozitů nepřesáhla 20 minut.*

1. Připravte si experimentální plán pro analýzu vzorků a kontrol a dbejte na to, abyste pozitivní kontroly (PEC-BVDV / TPC-EN-BVD/PAC-BVDV) oddělili od ostatních vzorků.
2. Rozmrazte zkumavku s **ARM-BVDV2** nebo **alikvotní část**, poté dobře homogenizujte (vířením) a krátce odstřeďte.

 *ARM rozmrazte ihned po rozmrazení, nejlépe při teplotě 5 °C (± 3 °C) nebo při pokojové teplotě (21 °C ± 5 °C), pokud použijete ihned po rozmrazení. Chraňte před dlouhodobým působením světla.*

 *Doporučuje se uchovávat všechny komponenty při teplotě 5 °C (± 3 °C) a při ukládání použít chladicí stojan pro PCR destičky/zkumavky.*

1. Do každé jamky dávkujte **8 µl ARM-BVDV2**. Používejte PCR destičky nebo zkumavky vhodné do termocykleru.

 *Ihned po použití zkumavku ARM nebo alikvotní část znovu zmrazte.*

1. Poté přidejte do příslušných jamek:
* Vzorky: **5 µl extraktu vzorku**
* Pozitivní kontrola extrakce: **5 µl extraktu PEC-BVDV** a/nebo cílové pozitivní kontroly pro vzorek z ušního zářezu: **5 µl TPC extrahované z EN-BVD**
* Pozitivní kontrola amplifikace: **5 µl PAC-BVDV**
* Negativní kontrola extrakce (NEC): **5 µl extraktu matrice NEC** a/nebo **extraktu procesu NEC**
* Negativní kontrola amplifikace (NAC): **5 µl vody bez nukleázy**
1. Zakryjte destičky nebo zkumavky lepicími fóliemi nebo jinými vhodnými uzávěry.
2. Krátce odstřeďte destičku nebo zkumavky, aby se zabránilo vzniku vzduchových bublin.

 *Před amplifikací, která by měla být provedena co nejdříve po uložení, by měla být destička skladována při teplotě 5 °C (± 3 °C).*

**Programování fáze amplifikace**

1. Naprogramujte termocykler tak, aby pro každou jamku analyzoval následující detektory:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| CÍL | KANÁL SCHOPNÝ ZJIŠŤOVAT HODNOTY | ZHÁŠEČ\* |
| **BVDV/BDV** | FAM | Nefluorescenční |
| **Endogenní necílová pozitivní kontrola (NTPCen)** | VIC/HEX | Nefluorescenční (VIC compatible /HEX) |
| **Exogenní necílové pozitivní kontroly** **(NTPC-(EN)-BVDV2)** | Cy5 | Nefluorescenční |

*Poznámka: Pro zařízení vyžadující interní referenci pro optickou kalibraci obsahuje zesilovací reakční směs ROX.*

\* *Pokud jde o zhášeč, nastavení parametrů přístroje pro barvivo TAMRA namísto nefluorescenčního barviva může u některých přístrojů zlepšit analýzu dat.*

1. Vyberte si ze 2 amplifikačních programů ověřených společností Innovative Diagnostics:
* **Rychlý program** (který umožňuje provést RT-qPCR přibližně za jednu hodinu).
* **Standardní program** (který je kompatibilní s amplifikačními programy nabízenými jinými výrobci činidel, a umožňuje tak simultánní analýzu).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| FÁZE | RYCHLÝ PROGRAM | STANDARNÍ PROGRAM | POČET CYKLŮ |
| **(1) Reverzní transkripce** | 10 minut při 45 °C | 10 minut při 45 °C | 1 |
| **(2) Aktivace polymerázy** | 2 minuty při 95 °C | 10 minut při 95 °C | 1 |
| **(3) Denaturace/prodloužení DNA** | 10 s při 95 °C30 s při 60 °C | 15 s při 95 °C60 s při 60 °C | 40 |

*Poznámka: Fluorescence se odečítá na konci fáze prodloužení při 60 °C.*

1. Zvolte konečný objem **13 µl**. Pokud se v jedné analýze kombinují různé objemy, vezměte v úvahu největší objem desky pro parametrizaci termocykleru.
2. Umístěte destičku nebo zkumavky do termocykleru a spusťte program.

|  |
| --- |
| **OVĚŘOVÁNÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ** |

**Validace testu**

Interpretace výsledků pro každý vzorek se provádí na základě získání charakteristické amplifikační křivky s použitím hodnot **Cq** (kvantifikační cyklus) nebo **Ct** (prahový cyklus) získaných pro každý z odečítacích kanálů.

Hodnoty Cq se určují ze základní linie (práh), kterou je třeba v závislosti na analytickém softwaru umístit ručně. Pro získání co nejreprodukovatelnějších výsledků je nezbytné, aby byla základní linie umístěna přesně. Jako pomůcku pro umístění základní linie naleznete obecnou příručku pro provádění technik molekulární biologie, která je na vyžádání k dispozici na adrese **info@innovative-diagnostics.com**

**Průběh RT-qPCR je validován, pokud níže popsané kontroly poskytují platné výsledky; poté lze provést interpretaci pro každý vzorek. V opačném případě nelze vzorky analyzovat a předúprava/extrakce a/nebo amplifikace RT-qPCR se musí opakovat.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| KONTROLA | SIGNÁL FAM BVDV/BDV | SIGNÁL VIC/HEX Endogenní NTPCen | SIGNÁL CY5 ExogenníNTPC-(EN)-BVDV2 | INTERPRETACE |
| **TPC-EN-BVD**Cílová pozitivní kontrola pro vzorek z ušního zářezu**PEC-BVDV**Pozitivní kontrola extrakce | +Vyhovující Cq\*. | + | +Vyhovující Cq\*. | Ověřuje přítomnost nukleových kyselin a amplifikaci RT-qPCR všech cílů.Hodnotu Cy5 Cq lze použít také jako referenční hodnotu, pokud není k dispozici vhodná matrice NEC. |
| **PAC-BVDV** | +Vyhovující Cq\* | - | - | Ověřuje procesy reverzní transkripce a amplifikace |
| **Proces NEC** | - | - | + | Ověřuje přítomnost nukleových kyselin exogenní kontroly a nepřítomnost kontaminace v pufrech použitých během předúpravy a extrakce. |
| **Matrice NEC** | - | +/- v závislosti na podílu buněk ve vzorku\*\*. | +Vyhovující Cq\*. | Lze nahradit proces NEC. Uvádí exogenní hodnotu Cy5 Cq, kterou lze použít jako referenční pro každou matrici, a endogenní Cq hodnotu VIC/HEX\*\*. |
| **NAC** | - | - | - | Žádná kontaminace během amplifikace. |

- : nezjištěno + : přítomnost charakteristické křivky

\* *Informace o hodnotách Cq naleznete v orientačních hodnotách uvedených na kontrolním listu kvality souvisejícím se šarží a/nebo v případě exogenního signálu Cy5 ve validačním souboru, který je k dispozici na vyžádání. Vezměte prosím na vědomí, že hodnoty Cq závisí na testovaných matricích, použitých extrakčních metodách a použitých termocyklerech. Společnost Innovative Diagnostics doporučuje, aby si každá laboratoř stanovila vlastní prahové hodnoty z kontrol (TPC-EN nebo matrice PEC/NEC / proces NEC).*

\*\* *U některých matric, kde je množství buněk proměnlivé (např. mléko, sérum), by se endogenní signál (NTPCen) neměl brát v úvahu.*

**Případy, které mohou zneplatnit analýzu**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| KONTROLA | SIGNÁL FAM BVDV/BDV | DOPORUČENÁ OPATŘENÍ PRO VŠECHNY VZORKY A KONTROLY, KTERÉ BYLY ZAHRNUTY DO TÉTO SÉRIE ANALÝZ |
| **NAC** | + | **Znovu proveďte krok amplifikace RT-qPCR.** |
| **PAC** | - | **Znovu proveďte krok amplifikace RT-qPCR.** |
| + ale nevyhovující Cq \*. |
| **PEC-BVDV / TPC-EN-BVD** | - | **Znovu proveďte předúpravu a extrakci.** |
| + ale nevyhovující Cq \*. |
| **Proces NEC / matrice NEC** | + |

- : nezjištěno + : přítomnost charakteristické křivky

**Navrhovaná interpretace výsledků**

**U každého analyzovaného vzorku lze provést interpretaci, pokud jsou splněna kritéria pro validaci vzorku** (viz oddíl: případ neinterpretovatelných vzorků). Výsledky lze interpretovat podle následujících kritérií:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| VZOREK | SIGNÁL FAM BVDV/BDV | SIGNÁL VIC/HEX EndogenníNTPCen | SIGNÁL CY5 ExogenníNTPC-(EN)-BVDV2 | INTERPRETACE |
| **Individuální** | + | - | - | **BVDV/BDV zjištěné ve vzorku**Potvrzení stavu imunotolerantního, trvale infikovaného zvířete (IPI) lze provést po opakované kontrole po 3 týdnech. |
| + | +/-\*\* | - |
| + | +Cq v souladu se signálem Cy5 související matrice NEC nebo, pokud to není možné, PEC \*. |
| - | + \*\* | **BVDV/ BDV nebyly ve vzorku zjištěny.** |
| - | - | **Žádný vzorek / znehodnocený vzorek.** |
| **Zařazeno do skupiny** | + | +/-\*\* | +Cq v souladu se signálem Cy5 související matrice NEC nebo, pokud to není možné, PEC \*. | **BVDV/BDV zjištěn alespoň u 1 zvířete ve směsi**: je nutná analýza jednotlivých vzorků. |
| - | **BVDV/BDV nebyly zjištěny u žádného ze vzorků ve skupině.** |
| - | - | **Vzorky, které tvoří skupinu, jsou znehodnoceny.** |

- : nezjištěno + : přítomnost charakteristické křivky

\* *Informace o hodnotách Cq naleznete v údajích uvedených na kontrolním listu kvality souvisejícím se šarží a/nebo v případě exogenního signálu Cy5 ve validačním souboru, který je k dispozici na vyžádání. Vezměte prosím na vědomí, že hodnoty Cq závisí na testovaných matricích, použitých extrakčních metodách a použitých termocyklerech. Společnost Innovative Diagnostics doporučuje, aby si každá laboratoř stanovila vlastní prahové hodnoty z kontrol (TPC-EN nebo PEC/ NEC-matrix /NEC-process).*

\*\* *Hodnotu endogenního signálu lze orientačně porovnat se signálem VIC/HEX související matrice NEC. U některých matric, u nichž je množství buněk proměnlivé (např. mléko, sérum), by se endogenní signál (NTPCen) neměl brát v úvahu. Příklady hodnot získaných za experimentálních podmínek (extrakční technika, termocykler atd.) ve společnosti Innovative Diagnostics jsou orientačně popsány v listu kontroly kvality a/nebo ve validačním souboru pro danou techniku.*

**Případy neinterpretovatelných vzorků**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| VZOREK | SIGNÁL FAMBVDV/BDV | SIGNÁL VIC/HEXEndogenníNTPCen | SIGNAL CY5ExogenníNTPC-(EN)-BVDV2 | DOPORUČENÁ OPATŘENÍ |
| **Individuální** | - | Není relevantní | - |  |
| + ale nevyhovující Cq \*: Rozdíl více než 3 Cq oproti signálu Cy5 přidružené matrice NEC nebo, pokud to není možné, signálu PEC | ***Možné příčiny:***Během distribuce vzorku došlo k problému nebopříprava/extrakce a/nebo reakce RT-qPCR byly inhibovány. |
| **Zařazeno** **do skupiny** | - | Není relevantní | - | ***Opatření, která je třeba provést:***1. Zřeďte extrakty na 1:10 ve vodě bez nukleázy a znovu proveďte krok amplifikace.
2. Pokud jsou výsledky stále nevyhovující\*\*, opakujte předběžnou úpravu/extrakci.
 |
| + ale nevyhovující Cq \*: Rozdíl více než 3 Cq oproti signálu Cy5 přidružené matrice NEC nebo, pokud to není možné, signálu PEC |

- : nezjištěno + : přítomnost charakteristické křivky

\**Cq VZOREK NTPC-(EN)-BVDV2 > Cq matrice NEC NTPC-(EN)-BVDV2 / PEC +3*

\*\**Žádný cílový signál FAM s exogenním signálem Cy5, který nepodléhá posunu 3 Cq logicky vyvolanému ředěním: přetrvávající inhibice. Pokud je cílový signál FAM stále negativní, ale ředění na 1:10 vyvolalo posun exogenního signálu Cy5 o 3 Cq, pak je přetrvávání inhibitorů nepravděpodobné a přítomnost vzorku od zvířete s IPI se zdá být nepravděpodobná.*

**Technická podpora a dokumentace**

V případě dotazů, technické podpory a protokolů nás prosím kontaktujte na adrese info@innovative-diagnostics.com

**Distributor v ČR a držitel rozhodnutí o schválení:**

O.K. SERVIS BioPro, s.r.o., Bořetická 2668/1, 193 00 Praha 9, Česká republika