Obsah obrázku text

Popis byl vytvořen automaticky

**Virus opičích neštovic Real Time PCR Kit**

**Návod k použití**

***Pouze pro výzkumné účely.***

**Kat.č.:** PDPS-AR064

**Č. šarže:** (viz obal produktu)

**1.Úvod**

Creative Biogene Virus opičích neštovic Real Time PCR kit se používá pro detekci viru opičích neštovic ve vzorcích séra nebo exsudátu z lézí. Kit obsahuje specifický systém ihned připravený k použití pro detekci viru opičích neštovic pomocí reverzně transkripční polymerázové řetězcové reakce (RT-PCR) v reálném času.

**2. Účel použití**

Virus opičích neštovic Real Time PCR kit je test pro detekci viru opičích neštovic ve vzorcích séra nebo exsudátu z lézí

**3. Princip PCR v reálném času**

Princip detekce v reálném čase je založen na fluorogenním 5'nukleázovém testu. Během PCR reakce DNA polymeráza štěpí sondu na 5' konci a odděluje reportérové ​​barvivo od zhášecího barviva pouze tehdy, když sonda hybridizuje s cílovou DNA. Toto štěpení má za následek uvolnění fluorescenčního signálu díky štěpení reportérového ​​barviva, který je monitorován v reálném čase pomocí PCR detekčního systému. Cyklus PCR, při kterém dochází ke zvýšení fluorescenční signálu je detekován (Ct) a je úměrný množství specifického PCR produktu. Monitorování intenzity fluorescence v reálném čase umožňuje detekci akumulace produktu, aniž by bylo nutné znovu otevírat reakční zkumavku po amplifikaci.

**4. Popis produktu**

Virus opičích neštovic je virus, který způsobuje onemocnění opičích neštovic jak u lidí, tak zvířat. Virus opičích neštovic je orthopox virus, rod z čeledi Poxviridae, který obsahuje další virové druhy, které infikují savce. Virus se vyskytuje hlavně v tropických deštných pralesech v oblastech střední a západní Afriky. Primární cestou infekce je považován kontakt s infikovanými zvířaty nebo jejich tělesnými tekutinami. Genom není segmentován a obsahuje jedinou molekulu lineární dvouvláknové DNA o délce 185 000 nukleotidů.

Virus opičích neštovic Real Time PCR kit obsahuje specifický systém ihned připravený k použití pro detekci viru opičích neštovic pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) v systému real-time PCR. Master mix obsahuje činidla a enzymy pro specifickou amplifikaci DNA viru opičích neštovic. Fluorescence je vyzařována a je měřena optickou jednotkou real time systémů během PCR. Detekce amplifikovaného DNA fragmentu viru opičích neštovic se provádí ve fluorimetrickém **kanálu FAM** s fluorescenčním zhášečem BHQ1. DNA extrakční pufr je k dispozici v kitu a vzorky séra nebo exsudátu z lézí se používají pro extrakci DNA. Navíc kit obsahuje systém pro identifikaci možné inhibice PCR pomocí měření fluorescence HEX/VIC/JOE interní kontroly (IC). Dodávaná externí pozitivní kontrola je definovaná jako 1×10^7 kopií/ml a umožňuje stanovení genové zátěže. Další informace naleznete v části **10.3 Kvantifikace**

**5. Obsah kitu**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Ref.** | **Typ reagencie** | **Dodávka**  **25 reakcí** |
| 1 | DNA Extrakční pufr | 1 lahvička, 1.8ml |
| 2 | MPV Reakční Mix | 1 lahvička, 950μl |
| 3 | PCR Enzymový Mix | 1 lahvička, 12μl |
| 4 | Voda molekulární jakosti | 1 lahvička, 400μl |
| 5 | Interní kontrola (IC) | 1 lahvička, 30μl |
| 6 | MPV Pozitivní kontrola (1×10^7 kopie/ml) | 1 lahvička, 30μl |

**Citlivost analýzy**: 5×10^3 kopií/ml

**LOQ**: 1×10^4~1×10^8 kopií/ml

**Poznámka:** Citlivost analýzy závisí na objemu vzorku, objemu eluce, metodě extrakce nukleových kyselin a dalších faktorech. Pokud použijete DNA extrakční pufr v kitu, citlivost analýzy je stejná, jak se deklaruje. Když je však objem vzorku desetkrát nebo dokonce stokrát větší než eluční objem díky koncentrační metodě, může být mnohem vyšší.

**6. Skladování**

• Všechny reagencie by měly být skladovány při -20°C. Skladování při +4°C není doporučeno.

• Všechny reagencie lze používat do data expirace uvedeného na obalu kitu.

• Je třeba se vyhnout opakovanému rozmrazování a zmrazování (>3x), může to snížit citlivost testu.

• Během pracovních kroků všechna činidla udržujte v chladu.

• Super mix by měl být skladován v temnu.

**7. Dodatečně požadované materiály a zařízení**

• Biohazard box

• Vortex

• Kryokontejner

• Sterilní špičky s filtry pro mikropipety

• Jednorázové rukavice, bez pudru

• Lednička a mraznička

• Real time PCR systém

• Real time PCR reakční zkumavky/destičky

• Pipety (0,5μl – 1000μl)

• Sterilní mikrozkumavky

• Nádoba na biologický odpad

• Stojany na zkumavky

• Stolní mikrocentrifuga pro zkumavky typu „eppendorf“ (RCF max. 16 000 x g)

**8. Varování a bezpečnostní opatření**

• Před zahájením postupu si pozorně přečtěte tento návod.

• Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.

• Tento test musí provádět kvalifikovaný personál.

• Klinické vzorky by měly být považovány za potenciálně infekční materiály a měly by být připravovány v boxu s laminárním prouděním.

• Tento test musí být proveden v souladu se správnou laboratorní praxí.

• Nepoužívejte kit po datu expirace.

• Vyhněte se opakovanému rozmrazování a zmrazování činidel, může to snížit citlivost testu.

• Jakmile jsou reagencie rozmrazeny, promíchejte je na vortexu a krátce odstřeďte zkumavky před použitím.

• Rychle připravte reakční směs na ledu nebo v chladícím bloku.

• Vymezte dvě samostatné pracovní oblasti:

1) Izolace RNA/DNA

2) Amplifikace/detekce amplifikačních produktů.

• Pipety, zkumavky a jiné pracovní materiály by neměly cirkulovat mezi pracovními jednotkami.

• Vždy používejte sterilní špičky s filtry.

• V každé oblasti noste samostatné pláště a rukavice.

• Nepipetujte ústy. V laboratoři nejezte, nepijte, nekuřte.

• Vyhněte se aerosolům.

**9. Odběr vzorků, skladování a přeprava**

• Odebírejte vzorky do sterilních zkumavek;

• Vzorky lze okamžitě extrahovat nebo zmrazit při -20°C až -80 °C.

• Přeprava klinických vzorků musí být v souladu s místními předpisy pro přepravu etiologických agens.

**10. Postup**

**10.1 Extrakce DNA**

DNA extrakční pufr je součástí kitu, prosím důkladně rozmrazte pufr a před použitím krátce odstřeďte v odstředivce. Je lepší použít komerční kit pro extrakci nukleových kyselin.

1) Napipetujte 50 µl vzorku (sérum nebo exsudáty z lézí rozpuštěné v 1 ml fyziologického roztoku) do 0,5ml zkumavky, přidejte 50µl DNA extrakčního pufru, uzavřete zkumavku a poté 10 sekund vortexujte. Krátce odstřeďte na stolní odstředivce.

2) Inkubujte zkumavku 10 minut při 100 °C.

3) Centrifugujte zkumavku při 13000 ot./min po dobu 10 minut. Supernatant obsahuje extrahovanou DNA a lze ji použít jako templát pro PCR.

**10.2 Interní kontrola**

Do reakční směsi je nutné přidat interní kontrolu (IC). Interní kontrola (IC) umožňuje uživateli stanovit a kontrolovat možnost inhibice PCR.

Přidejte interní kontrolu (IC) 1 µl/rxn a výsledek se zobrazí v HEX/VIC/JOE.

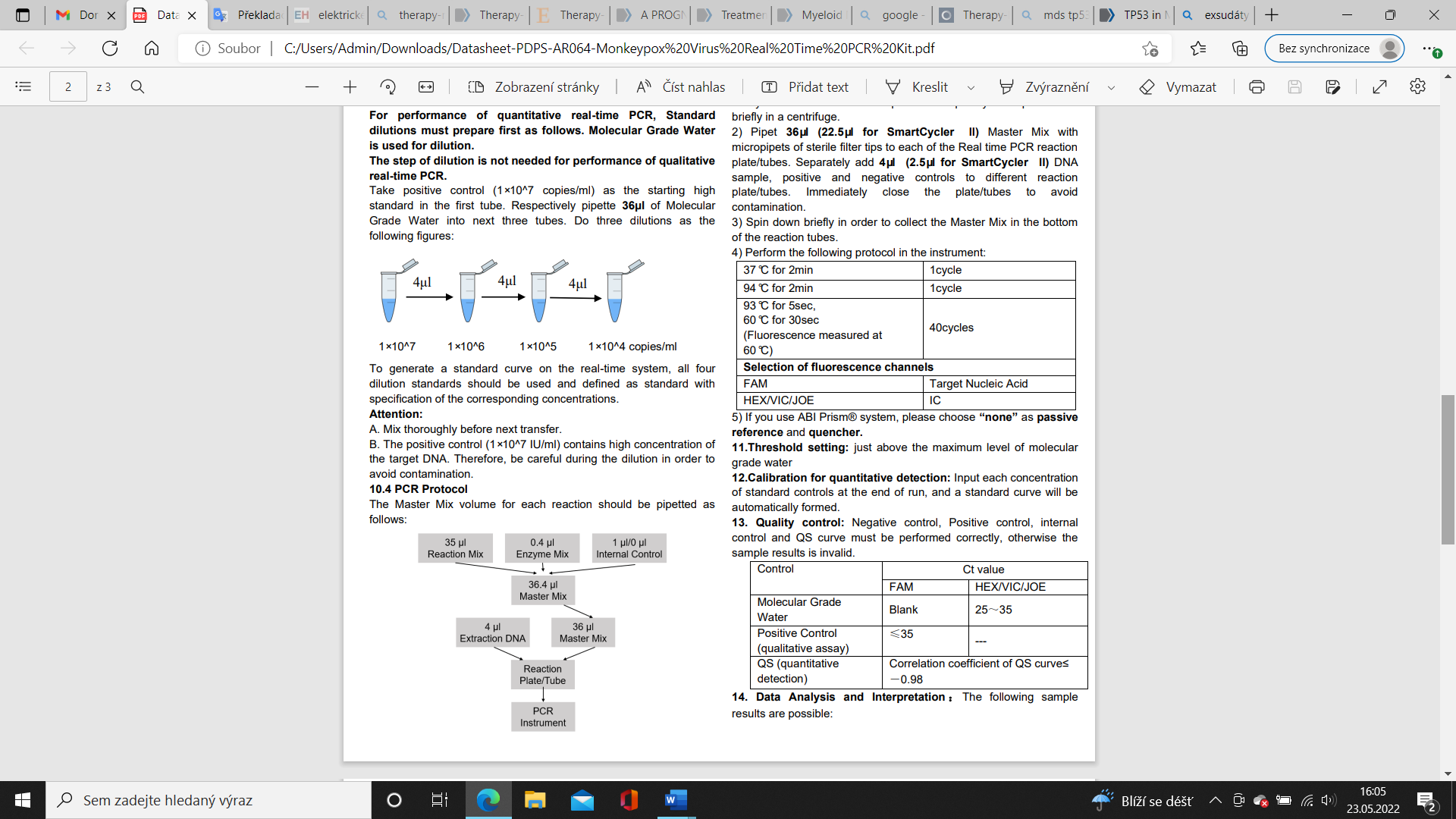
**10.3 Kvantifikace**

Kit lze použít pro **kvantitativní nebo kvalitativní** RT PCR v reálném čase.

**Pro provádění kvantitativní PCR v reálném čase se musí nejprve připravit ředění standardu podle schématu níže. K ředění se používá voda molekulární jakosti.**

**Krok ředění není nutný pro provedení kvalitativního PCR v reálném čase.**

Vezměte pozitivní kontrolu (1×10^7 kopií/ml) jako výchozí maximum standardu v první zkumavce. Respektive napipetujte 36μl vody molekulární jakosti do dalších tří zkumavek. Proveďte tři ředění podle schématu níže:



Pro generování standardní křivky na systému v reálném čase, všechny čtyři standardy ředění by měly být použity a měly by být definovány jako standardy s odpovídající koncentrací.

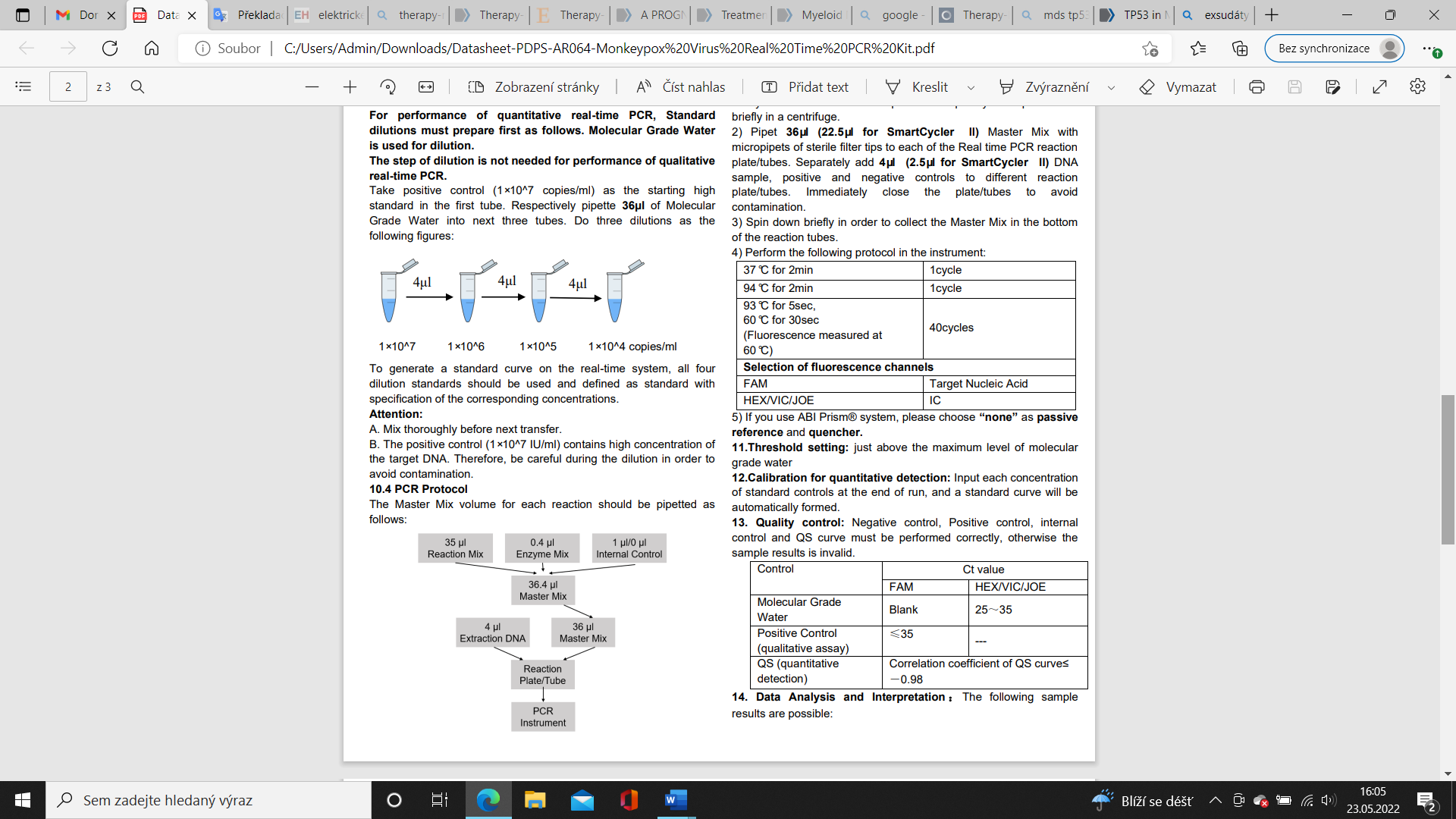
**Pozor:**

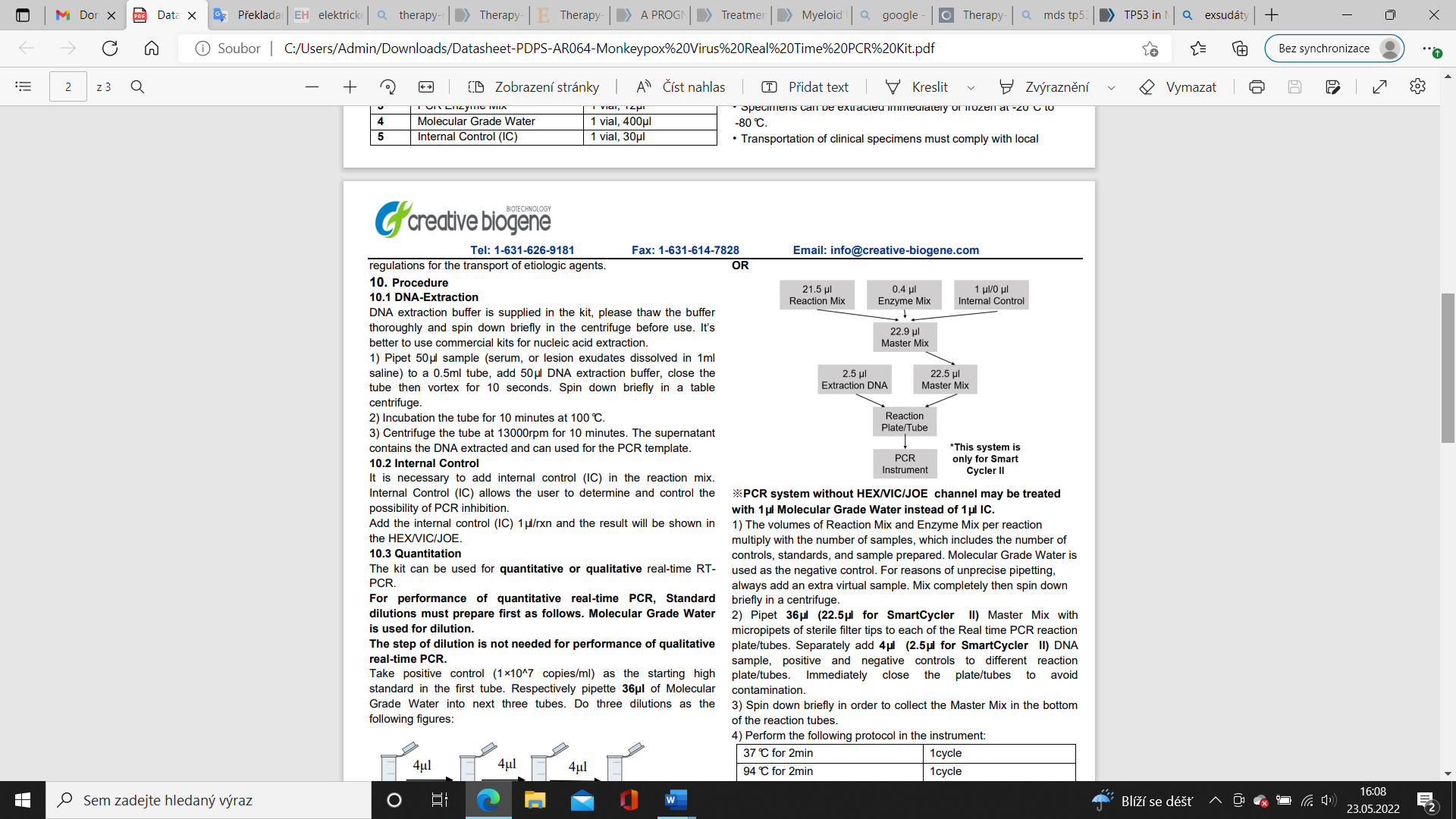
A. Před dalším přenosem důkladně promíchejte.

B. Pozitivní kontrola (1×10^7 IU/ml) obsahuje vysokou koncentraci cílové DNA. Proto buďte při ředění opatrní, abyste se vyhnuli kontaminaci.

**10.4 Protokol PCR**

Objem Master Mixu pro každou reakci by měl být pipetován následovně:





\*Tento systém je pouze pro Smart Cycler II

* PCR systém bez HEX/VIC/JOE kanálu může být ošetřen s 1 µl vody molekulární jakosti místo 1 µl IC.

1) Objemy reakční směsi a směsi enzymů na reakci vynásobte počtem vzorků, který zahrnuje i počet kontrol, standardů a připravených vzorků. Voda molekulární jakosti je použita jako negativní kontrola. Z důvodů nepřesného pipetování vždy přidejte další virtuální vzorek. Zcela promíchejte a poté odstřeďte krátce v odstředivce.

2) Napipetujte **36 µl (22,5 µl pro SmartCycler II)** Master Mixu mikropipetou se sterilní špičkou s filtrem do každé real time PCR destičky/zkumavky. Samostatně přidejte **4 µl (2,5 µl pro SmartCycler II)** DNA vzorku, pozitivní a negativní kontroly do různých reakčních destiček/zkumavek. Okamžitě uzavřete destičku/zkumavky, abyste se vyhnuli kontaminaci.

3) Krátce odstřeďte, aby se Master Mix shromáždil na dně reakčních zkumavek.

4) Spusťte v přístroji následující protokol

|  |  |
| --- | --- |
| 37°C - 2min | 1 cyklus |
| 94°C - 2min | 1 cyklus |
| 93°C - 5s,  60°C - 30s  (Fluorescence je měřena při 60°C) | 40 cyklů |
| **Výběr fluorescenčních kanálů** |  |
| FAM | Cílová nukleová kyselina |
| HEX/VIC/JOE | IC |

5) Pokud používáte systém ABI Prism®, vyberte prosím **„žádný“** jako **pasivní referenci a zhášeč.**

**11. Nastavení prahu:** těsně nad maximální úrovní vody molekulární jakosti.

**12. Kalibrace pro kvantitativní detekci:** Zadejte koncentraci každé standardní kontroly na konci cyklu a automaticky se vytvoří standardní křivka.

**13. Kontrola kvality:** Negativní kontrola, pozitivní kontrola, interní kontrola a QS křivka musí být provedena správně, jinak výsledky vzorku jsou neplatné.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Kontrola | Hodnota Ct | |
| FAM | HEX/VIC/JOE |
| Voda molekulární jakosti | blank | 25～35 |
| Pozitivní kontrola (kvalitativní test) | ≤35 | --- |
| QS (kvantitativní detekce) | Korelační koeficient QS křivky ≤ -0,98 | |

**14. Analýza dat a interpretace:** následující příklady výsledků jsou možné:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Hodnota Ct | | Výsledky analýzy |
| FAM | HEX/VIC/JOE |  |
| 1 | blank | 25-35 | Pod detekčním limitem nebo negativní. |
| 2 | ≤38 | --- | Pozitivní a software znázorní kvantitativní hodnotu |
| 3 | 38-40 | 25-35 | Opakujte test, pokud je stále 38-40, interpretujte jako 1 |
| 4 | blank | blank | Inhibice PCR, žádná diagnóza nemůže být stanovena |

**Pro použití s ABI Prism® 7000/7300/7500/7900/Step One Plus; iCycler iQ™4/iQ™5; Smart Cycler ll; BioRad CFX 96; Rotor Gene™ 6000; Mx3000P/3005P; MJ-Option2/Chromo4; LightCycler®480 přístroj.**