virotype ASFV PCR Kit Příručka

Pro detekci DNA z viru africké prasečí horečky (ASFV)

 24 reakcí (kat. č. VT281903)  96 reakcí (kat. č. VT281905)

INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Deutscher Platz 5b, 04103 Leipzig, Německo





Obsah

[Obsah soupravy 3](file:///C:\Users\hoferkova\Documentum\Checkout\Virotype%20ASFV%20PCR%20Kit_PI.docx#_Toc87354511)

[Účel použití 3](#_Toc87354512)

[Symboly 4](#_Toc87354513)

[Kontrola kvality 4](#_Toc87354514)

[Skladování 5](#_Toc87354515)

[Bezpečnostní informace 5](#_Toc87354516)

[Úvod 6](#_Toc87354517)

[Princip 6](#_Toc87354518)

[Extrakce DNA 7](#_Toc87354519)

[Vybavení a reagencie, které má zajistit uživatel 9](#_Toc87354520)

[Důležitá upozornění 10](#_Toc87354521)

[Všeobecná bezpečnostní opatření 10](#_Toc87354522)

[Protokol: PCR v reálném čase pro detekci DNA z viru africké prasečí horečky 12](#_Toc87354523)

[Důležité pokyny před zahájením 12](#_Toc87354524)

[Co je třeba udělat, než začnete 12](#_Toc87354525)

[Postup 12](#_Toc87354526)

[Analýza a interpretace údajů 15](#_Toc87354527)

[Interpretace výsledků 15](#_Toc87354528)

Positive Control (pozitivní kontrola) (zkumavka s červeným uzávěrem)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Obsah soupravy |  | |
| **virotype ASFV PCR Kit** | **(24)** | **(96)** |
| **Kat. č.** | **VT281903** | **VT281905** |
| **Počet reakcí** | **24** | **96** |
| Master Mix (směs master mix) (zkumavka s oranžovým uzávěrem), | 1× 500 µl | 2× 980 µl |
| obsahuje primery, sondy a enzymy |  |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Obsah soupravy |  | |
| **virotype ASFV PCR Kit** | **(24)** | **(96)** |
| **Kat. č.** | **VT281903** | **VT281905** |
| **Počet reakcí** | **24** | **96** |
| Master Mix (směs master mix) (zkumavka s oranžovým uzávěrem), | 1× 500 µl | 2× 980 µl |
| obsahuje primery, sondy a enzymy |  |  |

1× 25 µl 1× 150 µl

1× 150 µl

1× 25 µl

Negative Control (negativní kontrola)

(zkumavka s modrým uzávěrem)

Příručka 1

# Účel použití

Souprava virotype ASFV PCR Kit je určena pro detekci DNA z viru *African Swine Fever Virus* (ASFV) ve vzorcích séra, plazmy, krve s EDTA, tkání a stěrů od prasat domácích a divokých.

Souprava je schválena ústavem Friedrich-Loeffler-Institut a obdržela licenci podle § 11 (2) německého zákona o veterinární péči (FLI-B 670) pro použití v Německu pro veterinární diagnostické účely.

Pouze pro veterinární použití.

# Symboly

Zákonný výrobce  Číslo šarže



 Datum použitelnosti

 Teplotní omezení pro skladování  Příručka

 Katalogové číslo  Číslo materiálu

 Chraňte před světlem

 Pro vzorky od prasat domácích a prasat divokých

# Kontrola kvality

V souladu se systémem managementu kvality společnosti INDICAL certifikovaným podle norem ISO byla každá šarže soupravy virotype ASFV PCR Kit testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zaručena konzistentní kvalita produktu.

# Skladování

Komponenty soupravy virotype ASFV PCR Kit se skladují při teplotě - 30 °C až -15 °C a jsou stabilní do data použitelnosti uvedeného na štítku. Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení (> 2x), snižuje se tím senzitivita analýzy. Jednotlivé komponenty zmrazte v alikvotních množstvích, budou-li se používat pouze nepravidelně.

# Bezpečnostní informace

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL). Jsou k dispozici u místního obchodního zástupce nebo na vyžádání e-mailem zaslaným na adresu [**compliance@indical.com**.](mailto:compliance@indical.com)

Všechny zbytky vzorků a předměty, které přišly do styku se vzorky, je nutné dekontaminovat nebo zlikvidovat jako potenciálně infekční materiál.

# Úvod

Souprava virotype ASFV PCR Kit je vysoce citlivý a specifický roztok pro detekci DNA z viru *African Swine Fever Virus* (ASFV) ve vzorcích od prasat domácích a divokých.

Africký mor prasat (AMP) je jedním z nejzávažnějších infekčních virových onemocnění prasat všech věkových skupin, které způsobuje celou řadu klinických příznaků charakterizovaných vysokou morbiditou a mortalitou. Výskyty onemocnění je nutné hlásit Světové organizaci pro zdraví zvířat (World Organization for Animal Health, OIE).

Původcem je virus s dvouvláknovou DNA z čeledi *Asfarviridae*, rod *Asfivirus*. Virus ASF může být přenášen přenašeči (klíšťáky rodu *Ornithodoros*), a proto je zařazen do skupiny *Arbovirus* (virů přenášených členovci).

Vysoká citlivost soupravy virotype ASFV PCR Kit umožňuje časnou detekci patogenu ve vzorcích od jednotlivců i ve směsných vzorcích séra, plazmy, krve s EDTA, tkáně a materiálu ze stěrů od prasat domácích a divokých.

# Princip

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) je založena na amplifikaci specifických oblastí genomu původce. Identifikace amplifikátu probíhá při PCR v reálném čase pomocí fluorescenčních barviv. Barviva jsou zpravidla vázaná na oligonukleotidové sondy, které se vážou specificky na PCR amplifikát. Monitorování intenzity fluorescence v průběhu PCR v reálném čase umožňuje detekci kumulujícího se produktu, aniž by bylo nutné poté znovu otevírat reakční zkumavky.

Souprava virotype ASFV PCR Kit obsahuje všechny potřebné reagencie pro detekci DNA ASFV včetně reagencií Positive Control a Negative Control. Interní kontrola vylučuje možnost falešně negativních výsledků.

Souprava využívá dvě specifické kombinace primeru a sondy:

* fluorescenci FAM pro DNA viru ASFV,
* fluorescenci HEX pro interní kontrolu (β-aktin přítomný ve vzorku).

Reagencie Positive Control slouží k ověření funkčnosti reakční směsi pro amplifikaci DNA cílového viru.

# Extrakce DNA

Soupravu virotype ASFV PCR Kit lze použít pro detekci DNA viru ASFV ze vzorků séra, plazmy, krve s EDTA, tkání a stěrů od prasat domácích a divokých.

Díky vysoké senzitivitě testu je možné vyšetřovat vzorky od jednotlivců

i směsné vzorky. Za předpokladu dobré kvality vzorků je možné použít směsi séra, plazmy, krve s EDTA nebo tkání až od 20 jednotlivců. Vzorky z mrtvých volně žijících živočichů se doporučuje testovat individuálně.

**Poznámka**: Pro použití v Německu platí specifikace uvedené v části

„Amtliche Methodensammlung“.

Před provedením PCR v reálném čase je nutné z výchozího materiálu extrahovat DNA viru. Společnost INDICAL nabízí řadu validovaných souprav pro extrakci DNA ze vzorků těl zvířat.

Extrakce založená na magnetických kuličkách:

* MagAttract 96 cador Pathogen Kit\*

Extrakce založená na odstřeďovacích kolonkách:

* QIAamp cador Pathogen Mini Kit\*
* cador Pathogen 96 QIAcube HT Kit\* (nehodí se pro vzorky krve)

\*vhodné pro současnou extrakci DNA viru ASFV a RNA viru CSFV

**Poznámka**: Při použití náročného materiálu vzorku se doporučuje použít „Pretreatment T4 (extrakce fenolu)“.

Není-li PCR v reálném čase provedena ihned po extrakci, DNA uchovejte při teplotě -20 °C nebo v případě delšího skladování při teplotě -70 °C.

Další informace o automatizované a manuální extrakci DNA viru ASFV z různých druhů vzorků naleznete v příslušné příručce, nebo kontaktujte oddělení podpory společnosti INDICAL na adrese [**support@indical.com**.](mailto:support@indical.com)

# Vybavení a reagencie, které má zajistit uživatel

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL), které obdržíte od dodavatele výrobku.

* Pipety
* Pipetovací špičky s filtry, bez nukleázy, odolné proti aerosolu
* Sterilní zkumavky 1,5 ml Eppendorf
* Spotřební materiál bez nukleázy (RNázy/DNázy). Zvláštní péči je nutno věnovat tomu, aby nedošlo ke kontaminaci všech reagencií a spotřebních materiálů použitých pro přípravu PCR pro citlivou identifikaci nukleových kyselin viru
* Chladicí zařízení nebo led
* Stolní centrifuga s rotorem pro 1,5ml zkumavky
* Cykler pro PCR v reálném čase s příslušnými fluorescenčními kanály
* Vhodný software pro zvolený cykler pro PCR v reálném čase
* Vhodné zkumavky ve stripu a uzávěry nebo 96jamková optická mikrotitrační destička s optickou těsnicí fólií nebo krytem pro zvolený cykler pro PCR v reálném čase

# Důležitá upozornění

## Všeobecná bezpečnostní opatření

Uživatel musí vždy věnovat pozornost následujícím okolnostem:

* Používejte pipetovací špičky s filtry a bez nukleázy.
* Skladujte, extrahujte a přidávejte pozitivní materiál (vzorky, pozitivní kontroly a amplifikáty) do reakční směsi na jiném místě než všechny ostatní reagencie.
* Všechny komponenty před počátkem analýzy rozmrazte na ledu.
* Následně komponenty promíchejte převracením a krátce centrifugujte.
* Nepoužívejte komponenty testovací soupravy s prošlým datem použitelnosti.
* Vzorky a kontroly během přípravy reakcí uchovávejte na ledu nebo  
  v chladicím bloku.

Negativní kontrola

Součástí každého cyklu PCR by měla být alespoň jedna reakce negativní kontroly, která obsahuje všechny složky reakce kromě templátu patogenu. Umožňuje to posouzení kontaminace při reakci.

Pozitivní kontrola

Při provádění PCR na neznámých vzorcích se doporučuje provést reakci pozitivní kontroly v cyklu PCR obsahujícím vzorek, o němž je známo, že obsahuje DNA cílového viru. Pozitivní kontrola slouží k prokázání funkčnosti analýzy patogenů, např. správné přípravy reakční směsi. Použijte 5 µl reagencie Positive Control dodané v soupravě virotype ASFV PCR Kit pro testování úspěšné amplifikace cílového viru.

Kontrola extrakce a amplifikace

Pro vyšší bezpečnost a komfort při zpracování je zařazena kontrolní analýza extrakce a amplifikace ve formě sady druhého primeru a sondy, která detekuje referenční gen (tzv. housekeeping gene) přítomný ve vzorku. Ten umožňuje sledování extrakce i amplifikace.

# Protokol: PCR v reálném čase pro detekci DNA z viru africké prasečí horečky

## Důležité pokyny před zahájením

* Před zahájením si přečtěte část „Důležitá upozornění“ na straně 10.
* Do každého cyklu PCR zařaďte alespoň jednu pozitivní kontrolu (Positive Control) a jednu negativní kontrolu (Negative Control).
* Před zahájením postupu si prostudujte protokol a seznamte se s obsluhou zvoleného cykleru pro PCR v reálném čase.
* Proveďte protokol bez přerušení.

## Co je třeba udělat, než začnete

* Všechny reagencie rozmrazte na ledu a chraňte je před světlem.
* Reagencie během přípravy PCR uchovávejte na ledu.
* Reagencie před použitím krátce odstřeďte.

## Postup

1. Do každé reakční zkumavky pipetou odměřte 20 µl směsi Master Mix. Poté přidejte 5 µl vzorku DNA (Tabulka 1).

Zařaďte reakce pozitivní a negativní kontroly.

Positive Control: Místo vzorku DNA použijte 5 µl pozitivní kontroly (Positive Control).

Negative Control: Místo vzorku DNA použijte 5 µl negativní kontroly (Negative Control).

Tabulka 1. Příprava reakční směsi

**Složka** **Objem**

Master Mix 20 µl

Vzorek 5 µl

**Celkový objem 25 µl**

1. Reakční zkumavky uzavřete odpovídajícími uzávěry.
2. Nastavte filtry oznamovacího barviva v softwaru termocykleru podle Tabulka 2.

**Poznámka**: Při použití přístroje Rotor-Gene Q nastavte fixní hodnotu citlivosti k fluorescenci +4 v zeleném a +1 ve žlutém kanále pro zajištění optimální citlivosti načítání fluorescence pro analýzu patogenu a interní kontroly.

Tabulka 2. Nastavení filtru oznamovacího barviva

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Patogen / interní kontrola** | **Oznamovací barvivo** | **Rotor-Gene Q** |
| ASFV | FAM | zelená |
| Interní kontrola | HEX/ JOE | žlutá |
| Pasivní reference2 | RO | - |

1. Použijte volbu vhodnou pro používaný termocykler.
2. Interní reference pro použití se systémy detekce sekvencí Applied Biosystems ABI PRISM
3. Proveďte protokol PCR v reálném čase podle Tabulka 3, pokud provádíte pouze zpracování soupravy virotype ASFV PCR Kit.

Tabulka 3. Protokol PCR v reálném čase pro ASFV

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Krok** | **Teplota** | **Čas** | **Počet cyklů** |
| **Počáteční aktivace** | 95 °C | 15 min | 1 |
| **Cyklování ve 2 krocích** |  |  |  |
| Denaturace | 95 °C | 15 s | |
| Hybridizace/polymerizace\* | 60 °C | 60 s | |

40

\*Shromažďování dat o fluorescenci. Přibližná doba zpracování 96 min (Rotor-Gene Q)

1. Proveďte protokol RT-PCR v reálném čase podle Tabulka 4, pokud simultánně provádíte analýzu virotype CSFV.

Tabulka 4. Protokol RT-PCR v reálném čase pro simultánní amplifikaci virů ASFV a CSFV1

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Krok** | **Teplota** | **Čas** | **Počet cyklů** |
| **Reverzní transkripce** | 45 °C | 10 min | 1 |
| **Počáteční aktivace** | 95 °C | 10 min | 1 |
| **Cyklování ve 3 krocích**  Denaturace | 95 °C | 15 s |  |
| Hybridizace\*  Polymerizace | 57 °C  72 °C | 30 s  35 s | 40 |

1 platí pouze pro soupravu virotype CSFV RT-PCR Kit.

\*Shromažďování dat o fluorescenci. Přibližná doba zpracování 118 min (Rotor-Gene Q)

# Analýza a interpretace údajů

## Interpretace výsledků

Aby byla analýza platná, reagencie Positive Control musí mít signál v kanálu FAM i HEX CT1 <35. Reagencie Negative Control nesmí mít žádný signál.

Při práci s neznámými vzorky jsou možné následující výsledky. Možné výsledky vzorků jsou též shrnuty v Tabulka 5 na straně 17.

**Vzorek je pozitivní na ASFV a analýza je platná, jsou-li splněna tato kritéria:**

* Vzorek dává signál v kanálech FAM i HEX.
* Positive Control dává signál v kanálech FAM i HEX.
* Negative Control nedává signál v kanálech FAM a HEX.

Upozorňujeme, že velmi vysoké koncentrace DNA ASFV ve vzorku mohou vést ke sníženému nebo nulovému signálu HEX z důvodu kompetice s interní kontrolou.

**Vzorek je negativní na ASFV a analýza je platná, jsou-li splněna tato kritéria:**

* Vzorek dává signál pouze v kanálu HEX.
* Positive Control dává signál v kanálech FAM i HEX.
* Negative Control nedává signál v kanálech FAM a HEX.

1 Prahový cyklus (CT) – cyklus, při němž amplifikační graf překročí prahovou hodnotu, tj. došlo k prvnímu jednoznačně detekovatelnému zvýšení fluorescence

Pozitivní signál v kanálu HEX znamená, že extrakce a amplifikace byly úspěšné, neboť došlo k amplifikaci referenčního genu ve vzorku. Pokud je však hodnota CT interní kontroly > 35, mohlo dojít k částečné inhibici směsných vzorků nebo vzorků od jednotlivců. V takových případech se doporučuje příslušné vzorky od jednotlivců zředit (např. v poměru 1:5) beznukleázovou vodou a test zopakovat.

**Výsledky vzorku jsou nejednoznačné a analýza je neplatná, nastanou-li tyto situace:**

* Vzorek nedává signál v kanálech FAM ani HEX.

Není-li v kanálu FAM (patogen) ani HEX (interní kontrola) detekován žádný signál, výsledek je nejednoznačný. Nepřítomnost signálu pro referenční gen znamená inhibici PCR a/nebo jiné závady.

Chcete-li ověřit inhibici, doporučujeme zředit DNA vzorku v beznukleázové vodě v poměru 1:5 a zopakovat extrakci DNA, nebo zopakovat celý postup testu s použitím nového materiálu vzorku.

Zkontrolujte, zda v kanálu FAM existuje fluorescenční signál pro reakci pozitivní kontroly (Positive Control). Nepřítomnost signálu pro reagencii Positive Control znamená chybu, která může být způsobena nesprávnou přípravou reakční směsi nebo nesprávnými podmínkami při provádění cyklu.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Tabulka 5. Tabulka interpretace výsledků\* |  | |
| **Výsledek vzorku** | **FAM (ASFV)** | **HEX (IC)** |
| Pozitivní na ASFV | X | X |
| Pozitivní na ASFV  X  (silně pozitivní) | | |

Negativní na ASFV X

nejednoznačný

nejednoznačný

\*Výsledky vzorku lze interpretovat za předpokladu, že jsou provedeny reakce pozitivní a negativní kontroly. Pozitivní kontrola musí dávat signál v kanálech FAM i HEX. Negativní kontrola nesmí dávat signál v kanálu FAM ani HEX. Úplné vysvětlení možných výsledků vzorku naleznete v části „Analýza a interpretace údajů“ na straně 15.

Společnost INDICAL nabízí řadu souprav ELISA a souprav pro PCR v reálném čase a souprav pro RT-PCR v reálném čase pro detekci zvířecích patogenů.

Další informace o produktech bactotype, cador, cattletype, flocktype, pigtype a virotype naleznete na stránkách [**www.indical.com**.](http://www.indical.com/)

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti pro konkrétní produkty jsou uvedeny v příručce pro soupravu INDICAL nebo příručce uživatele.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Příručka** | **Verze** | **Změna** |
| HB-1881-EN-004 | Listopad 2018 | doplnění části „Interpretace výsledků“ |
| HB-1881-EN-003 | Duben 2020 | Design INDICAL |

Objednávání: [**www.indical.com/contact**](http://www.indical.com/contact)Technická podpora: [**support@indical.com**](mailto:support@indical.com)Webové stránky: [**www.indical.com**](http://www.indical.com/)