Test RealPCR ASFV DNA

Pouze pro veterinární účely.

Název a určené použití

Test RealPCR ASFV DNA se používá k detekci DNA viru afrického moru prasat (ASFV) extrahované ze vzorků séra, plazmy, krve s EDTA, orálních tekutin, tkání (plíce, slezina, ledviny, kostní dřeň lymfatické uzliny a tonzily) a z výtěrů odebraných prasatům, včetně prasat divokých. Odebrané materiály je možné testovat formou směsných vzorků sestávajících až z 20 individuálních vzorků. Testování směsného vzorku, který zahrnuje byť jen jediný slabě pozitivní vzorek (např. Ct > 32), může vést k negativnímu výsledku kvůli nesprávnému ředění při přípravě směsného vzorku.

Poznámka: Co se týká vzorků z výtěrů, v Polsku je možné používat pouze krevní vzorky.

Obecné informace

Virus afrického moru prasat je původcem hemoragického afrického moru prasat. ASFV je mimořádně nakažlivý patogen, který vzhledem k subklinickým příznakům onemocnění může způsobovat perzistentní infekci prasat bradavičnatých, štětkounů afrických a také klíšťáků rodu Onrithodoros. ASFV způsobuje u prasat domácích vysokou morbiditu a mortalitu a podléhá hlášení Světové organizaci pro zdraví zvířat (OIE). Kontrola vzplanutí ASFV je založena zejména na včasné detekci viru. Test RealPCR ASFV DNA je vysoce citlivým a specifickým nástrojem detekce DNA viru.

IDEXX RealPCR je modulární systém, v němž jsou cílové směsi specifické pro dané onemocnění spárovány se standardizovanými směsmi vzorové DNA nebo RNA a jednou směsnou pozitivní kontrolou. Reagencie jsou baleny individuálně a prodávány zvlášť, aby s nimi bylo možné manipulovat, pokud možno flexibilně.

Směs RealPCR ASFV DNA Mix (směs ASFV DNA Mix) obsahuje primery a sondy pro detekci DNA ASFV při amplifikaci se směsí vzorové RealPCR DNA (DNA MMx). Interní kontrola testu vychází z průkazu sekvence genomové DNA ve vzorku, která je u prasat zachována. Tento genomový cíl se v tomto protokolu označuje jako interní kontrola vzorku (ISC). Průkaz endogenní DNA v testovaných vzorcích kontroluje adici, extrakci a amplifikaci vzorku. Směs ASFV DNA Mix obsahuje primery a sondu pro průkaz interní kontroly vzorku. K dispozici je také volitelná interní pozitivní kontrola, jmenovitě interní pozitivní kontrola RealPCR (IPC > v1.2), kterou je třeba použít v případě nízké hladiny endogenní hostitelské DNA nebo v situaci, kdy je její přítomnost po extrakci nepravděpodobná (např. vzorky krmiva). IPC obsahuje syntetickou verzi porcinního cíle ISC DNA a je tudíž kompatibilní se směsí ASFV DNA Mix. Viz pokyny v příbalovém letáku k interní pozitivní kontrole RealPCR (REF 99-56330).

Materiál a uchovávání

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Označení / obecné informace | Barva uzávěru | Množství | Uchovávání | Cykly zmrazení/rozmrazení |
|  |  | 100 testů | Při převzetí | Po rekonstituci |  |
| Směs RealPCR ASFV DNA Mix (směs ASFV DNA), suchá | Zelená | 1 x 1,0 ml | -25 až 8 °C | -25 až -15 °C | ≤6 |
| ref 99-56020Rekonstituujte pomocí čištěné vody určené pro metodu PCR (PCR Grade Water) pro dosažení objemu 1 ml. Směs ASFV DNA Mix uchovávejte v temnu. Datum exspirace na lahvičce platí pro suchou i rekonstituovanou formu. Etiketa na zkumavce se směsí ASFV DNA Mix označuje verzi PC, která je kompatibilní s cílovou směsí. Příklad: PC ≥ v1.4 znamená, že cílovou směs je možné použít s PC verzí 1.4 a novějšími verzemi. |
| Vzorová směs RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx) | Fialová | 1 x 1,0 ml | -25 až -15 °C (dlouhodobě) | N/A | ≤6 |
| ref 99-56250Koncentrovaná vzorová směs, která obsahuje hot-start polymerázu pro použití s cílovými směsmi DNA v systému IDEXX RealPCR. DNA MMx je viskóznější než většina vzorových směsí – doporučený způsob manipulace viz část Postup testování. Pro normalizaci objemových nepřesností bylo přidáno referenční barvivo (ROX). Směs DNA MMx chraňte před světlem. |
| Pozitivní kontrola RealPCR, suchá (PC) | Modrá | 1 x 500 µl | -25 až 8 °C | -25 až -15 °C | ≤6 |
| ref 99-56310Rekonstituujte pomocí čištěné vody určené pro metodu PCR (PCR Grade Water) pro dosažení objemu 500 µl. PC obsahuje všechny cíle (targets) IDEXX RealPCR a ISC (včetně cíle pro ASFV) a je určena k použití se všemi cílovými směsmi IDEXX RealPCR. Datum exspirace na lahvičce platí pro suchou i rekonstituovanou formu. PC je označena číslem verze (např. v1.3). Jakmile jsou pro produktovou řadu RealPCR vytvořeny nové cílové směsi, cílové sekvence jsou přidány do PC a číslo verze PC se aktualizuje (např. v1.3 se zvýší na v1.4).PC zahrnuje Signaturu IDEXX (unikátní sekvence oligonukleotidů). Přítomnost Signatury IDEXX v pracovním prostředí poukazuje na kontaminaci PC. Laboratoře, které chtějí monitorovat kontaminaci PC, mohou detekovat Signaturu IDEXX s použitím směsí RealPCR PC Tracker DNA Mix a RealPCR DNA MMx. |
| Voda RealPCR PCR Grade | Čirá | 2 x 1,0 ml | -25 až 8 °C | N/A |
| ref 99-56350Čištěná voda určená pro PCR metodu (PCR Grade Water) je kvalifikována pro použití při reverzní transkripci-PCR (RT-PCR). Používá se k rekonstituci reagencií RealPCR. Používá se také jako PCR negativní kontrola pro každou testovací várku. Lahvičky s touto vodou nepřesunujte mezi různými pracovními oblastmi PCR. Pro každou oblast je nutné použít samostatnou lahvičku s vodou, aby nedošlo ke kontaminaci. |
| Poznámka: V tabulce na konci tohoto dokumentu je uveden popis symbolů používaných v příbalové informaci a na etiketě. |

Potřebné materiály, které nejsou součástí soupravy

* Komerční souprava pro extrakci DNA
* Volitelné – centrifuga s rotorem a adaptéry pro destičky s více jamkami
* Mikrocentrifuga pro odstřeďování mikrozkumavek o objemu 2 ml, která může dosáhnout 1500–3000 × g
* Vhodné osobní ochranné pomůcky (např. rukavice, laboratorní plášť)
* Hroty pipet bez nukleázy, odolné proti aerosolům
* Sterilní mikrozkumavky pro přípravu směsi PCR
* Pipety (5–1000 µl); speciální pipety pro přípravu směsi PCR
* 96 nebo 384jamkové PCR destičky a optické adhezivní fólie/kryty destiček
* Přístroj pro provádění PCR v reálném čase (Applied Biosystems 7500, Applied Biosystems 7500 Fast System [rychlý režim], Applied Biosystems ViiA 7, Applied Biosystems QuantStudio 5, Agilent Mx3000P, Agilent Mx3005P, Agilent AriaMx, Bio-Rad CFX96 Touch, Bio Molecular Systems Mic qPCR Cycler, QIAGEN Rotor-Gene [pouze 72jamkový rotor], Roche LightCycler 480 nebo podobný).

Poznámka: přístroj Roche LC480 vyžaduje další kalibraci a nastavení softwaru. Informace o používání výše uvedených přístrojů s reagenciemi RealPCR vám poskytnou pracovníci odborné podpory IDEXX.

Laboratorní postupy a varování

* Nepoužívejte reagencie po datu exspirace.
* Celý proces je nutné provádět za nepřítomnosti nukleázy.
* Při práci s reagenciemi a nukleovými kyselinami používejte rukavice bez pudru.
* Pro zabránění zkřížené kontaminace provádějte veškeré příslušné činnosti s použitím hrotů pipet bez nukleázy, které jsou odolné vůči aerosolům, a fyzicky separujte pracoviště, kde dochází k extrakci nukleové kyseliny (a manipulaci s ní), nastavení PCR a provádění PCR.

Rekonstituce suchých složek

Směs ASFV DNA Mix a pozitivní kontrolu rekonstituujte pipetováním vody PCR Grade pro dosažení objemu uvedeného na etiketě příslušné složky. Roztok nechte stát po dobu nejméně 10 minut při teplotě 18 až 26 °C. Před použitím promíchejte a krátce odstřeďte pomocí mikrocentrifugy. Po rekonstituci směsi ASFV DNA Mix a pozitivní kontroly připravte příslušné alikvoty a roztoky uchovávejte ve zmrazeném stavu. Zmražené složky nechte před použitím rozmrazit po dobu přibližně 15 minut při teplotě 18 až 26 °C, jemně je promíchejte a krátce odstřeďte pomocí mikrocentrifugy (~1 500–3 000 × g).

Extrakce DNA

Směs ASFV DNA Mix byla validována pomocí níže uvedených komerčních extrakčních metod. Je možné použít také další metody extrakce a lýzy, pokud byly validovány v laboratoři.

Souprava MagMAX Pure-96 Viral RNA Isolation Kit (Thermo)

Minisouprava QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)

Souprava High Pure PCR Template Prep Kit (Roche)

Pokud není test proveden okamžitě po extrakci DNA, uchovávejte čištěnou DNA při teplotě < -15 °C. Jako vzorek by měla být zahrnuta také negativní kontrola pro extrakci („mock sample“).

Postup testu

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **1** | Příprava směsi PCR Mix. |  |  |
|  | * Rozmrazenou směs DNA MMx promíchejte převrácením nebo jemným vortexováním zkumavky.
* DNA MMx je viskózní roztok, který je nutné pipetovat pomalu.
* Směs PCR Mix připravíte aplikací 10 µl směsi ASFV DNA Mix a 10 µl DNA MMx na každou reakci.
* Při přípravě směsi PCR Mix nejprve pipetujte směs ASFV DNA Mix do zkumavky a poté přidejte směs DNA MMx. Propláchněte hrot pipety s MMx tak, že roztok několikrát nasajete do pipety a opět vypustíte.
* Důkladné promíchání jednotlivých složek zajistíte mírným vortexováním roztoku.
* Směs PCR Mix pomalu pipetujte na PCR destičku.
 |
|  | Směs PCR Mix je možné uchovávat po dobu 24 hodin při teplotě 2 až 8 °C nebo po dobu 2 týdnů při teplotě -25 až -15 °C. Chraňte před světlem. |
| **2** | Pipetou aplikujte 20 µl směsi PCR Mix do příslušných jamek destičky s více jamkami. |
| **3** | Do každé jamky přeneste 5 µl vzorku DNA. Konečný objem pro reakci je 25 µl. |
| **4** | Pro každou testovací várku přidejte pozitivní kontrolu (5 µl) a PCR negativní kontrolu (5 µl vody PCR Grade Water). |
| **5** | Destičku uzavřete krytem, a pokud je třeba, jemně ji odstřeďte, aby se obsah jamek usadil a odstranily se vzduchové bublinky. |
| **6** | Pomocí programu IDEXX RealPCR Standard DNA/RNA Cycling Program nastavte termocykler. |
|  | Nastavení reportéru a zhášeče |
|  | Cíl | Reportér | Zhášeč |  |
|  | ASFV | FAM™ | BHQ®(není) |  |
|  |
|  | Interní kontrola(ISC/IPC) | HEX™ (VIC) | BHQ (není) |  |
|  |
|  | Pasivní reference | ROX™ | N/A |  |
|  | Program RealPCR\* Standard DNA/RNA Cycling Program |
|  |  | Teplota | Čas | Cykly |  |
|  | Reverzní transkripce (RT) | 50 °C | 15 min | 1 |  |
|  |
|  | Denaturace | 95 °C | 1 min | 1 |  |
|  |
|  | Amplifikace\*\* | 95 °C | 15 s | 45 |  |
|  | 60 °C | 30 s |  |
|  | \*\*Nastavte přístroj tak, aby zaznamenával fluorescenci až po amplifikaci při 60 °C. |
|  | **Poznámka:** Pro cíle DNA je možné spustit cyklovací protokol bez kroku RNA „RT“. Doporučujeme nicméně krok „RT“ používat rutinně, aby bylo možné testy RNA snadněji zařadit do pracovního postupu. |

|  |  |
| --- | --- |
| 7 | Analýza dat |
| Při nastavování softwaru přístroje zadejte každému cíli a interní kontrole unikátní identifikátor. Příklad: Pokud jsou cíle A a B na téže destičce, jamky A musí být analyzovány nezávisle na jamkách B. Způsob analýzy dat je uveden v konkrétním návodu k použití daného přístroje. Pro nastavení prahu použijte funkci Auto Ct. |
| * Agilent Mx3000P a Mx3005P – pro analýzu je nutné používat metodu fluorescence s prahovou hodnotou založenou na pozadí (background-based threshold fluorescence method).
 |
| * Přístroj QIAGEN Rotor-Gene – ručně nastavte prahovou přímku nad pozadí v lineární fázi exponenciální amplifikace. To lze nejsnáze provést v „log“ zobrazení grafů. Tento krok je třeba opakovat pro každý reportér v cílové směsi.
 |
| * Přístroje Applied Biosystems – automatické nastavení prahů v některých situacích nepřináší uspokojivé výsledky. V takových případech je nutné Ct hodnoty určit ručním nastavením prahu. To lze nejsnáze provést v „log“ zobrazení grafů. Tento krok je třeba opakovat pro každý reportér v cílové směsi.
 |
|  |
|  |
| Kritéria validity |
|  | Hodnota FAM Ct | Hodnota HEX (VIC) Ct |  |
|  | Pozitivní kontrola | <38 | <38 |  |
|  |
|  | PCR negativní kontrola | Není signál | Není signál |  |
|  |
| 8 | Interpretace výsledků |
|  | Výsledek testu vzorku | Signál FAM | Signál HEX (VIC) | Další charakteristiky |
|  | Detekována DNA ASFV | Ano | Ano/Ne | Pozitivní Ct hodnota a charakteristická křivka amplifikace v porovnání s PCR negativní kontrolou. |
|  |
|  | Očekává se amplifikační křivka interní kontroly v kanále HEX (VIC); u některých silně ASFV-pozitivních vzorků DNA může dojít k negativnímu výsledku interní kontroly.† |
|  |
|  | DNA ASFVnedetekována | Ne | Ano | Amplifikační křivka v kanále interní kontroly HEX (VIC). |
|  |  |  |  |  |
|  |
|  | Neplatné‡ | Ne | Ne | Absence amplifikační křivky v kanálech FAM a HEX (VIC) poukazuje na neplatný výsledek. |
|  |  |  |  |  |
| †Cílová směs je optimalizována pro detekci ASFV DNA; silně pozitivní vzorek DNA může vést k potlačení detekce interní kontroly. |
|  |
| ‡ Neplatný vzorek může poukazovat na nesprávnou aplikaci, extrakci a/nebo PCR vzorku. DNA by měla být zředěna pětinásobně čištěnou vodou (PCR Grade Water) a opětovně testována; jako vzor je třeba zahrnout neředěnou DNA. Pokud je test stále neplatný, doporučujeme provést novou extrakci. |
|  |
|  |

Odbornou pomoc získáte zde:

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 nebo +1 207 556 4895 IDEXX Europe Tel: +800 727 43399

Obraťte se na oblastního manažera nebo distributora IDEXX nebo navštivte naši webovou stránku: [idexx.com/contactlpd](http://idexx.com/contactlpd)

\*IDEXX, RealPCR a Test With Confidence jsou ochranné známky nebo registrované ochranné známky společnosti IDEXX Laboratories, Inc. nebo jejích obchodních poboček v USA a/nebo dalších zemích. Všechny další produkty a názvy a loga společností jsou ochrannými známkami svých držitelů.

Barviva, která jsou součástí tohoto produktu, jsou prodávána na základě licence společnosti Biosearch Technologies, Inc. a jsou chráněna patenty USA a mezinárodními patenty, ať už byly vydány nebo je o ně zažádáno. Licence pokrývá veterinární aplikace. Není určeno pro IVD použití u člověka.

Informace o patentu: [idexx.com/patents](http://idexx.com/patents)

© 2022 IDEXX Laboratories, Inc. Všechna práva vyhrazena.