



AmpliTest ASFV (Real Time PCR)

Zestaw do wykrywania sekwencji DNA specyficznych dla wirusa ASF (African Swine Fever) techniką Real Time PCR

<i>Nr kat.</i>	<i>Wielkość zestawu</i>
DV05-100	100 reakcji
DV05-300	300 reakcji

Zestaw diagnostyczny jest przeznaczony do profesjonalnego stosowania w laboratoriach badawczych oraz diagnostycznych.

Przed użyciem należy zapoznać się z treścią niniejszej ulotki dołączonej do zestawu diagnostycznego.

TRANSPORT

Transport zestawu **AmpliTest ASFV (Real Time PCR)** odbywa się w suchym lodzie. Po otrzymaniu przesyłki należy ją natychmiast rozpakować. Jeżeli stwierdzono uszkodzenie taśmy zabezpieczającej pudełko transportowe, uszkodzenie plomby opakowania handlowego lub brak suchego lodu w styropianowym pudełku transportowym należy o tym fakcie niezwłocznie powiadomić producenta zestawu.

SKŁADNIKI ZESTAWU

<i>Nazwa</i>	<i>Opis</i>	DV05-100 <i>100 reakcji</i>	DV05-300 <i>300 reakcji</i>	<i>Kolor wieczka probówki</i>
RM	Mieszanka reakcyjna	2 × 550 µL	6 × 550 µL	zielony
PC	Kontrola pozytywna	1 × 300 µL	3 × 300 µL	czerwony
NC	Kontrola negatywna	1 × 300 µL	3 × 300 µL	niebieski
Water	Woda	1 × 1,5 mL	2 × 1,5 mL	biały

WARUNKI PRZECHOWYWANIA I UŻYTKOWANIA

- Składniki zestawu należy przechowywać w -20°C.
- **UNIKAĆ EKSPOZYCJI SKŁADNIKA RM NA ŚWIATŁO.**
- Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania składników zestawu, w szczególności składnika **RM**. 10 cykli zamrożenia i rozmrożenia składnika **RM** nie wpływa znacząco na jakość zestawu.
- Termin ważności zestawu znajduje się na opakowaniu handlowym.
- Nie używać składników zestawu po upływie terminu ważności.

OPIS ZESTAWU

Zastosowanie

Zestaw **AmpliTest ASFV (Real Time PCR)** jest przeznaczony do wykrywania sekwencji DNA specyficznych dla wirusa ASF (African Swine Fever Virus), który wywołuje zakaźną i zaraźliwą chorobą świń domowych oraz przedstawicieli świniowatych, afrykański pomór świń (ASF). Choroba najczęściej ma ostry przebieg. Charakterystyczne objawy to gorączka krwotoczna, sinica skóry uszu, brzucha i boków ciała, duszność, pienisty wypływ z nosa, biegunka, wymioty. ASF w stadzie świń może czasem objawić się jedynie nagłymi padnięciami, bez innych objawów towarzyszących. Choroba powoduje wysoką śmiertelność (bliską 100%) u świń domowych, ludzie nie są wrażliwi na zakażenie wirusem ASF, w związku z czym choroba ta nie stwarza zagrożenia dla ich zdrowia i życia. Obecność sekwencji specyficznych dla patogenu diagnozuje się w preparatach DNA ekstrahowanych z krwi pełnej i tkanek świń. Zestaw diagnostyczny przeznaczony jest do diagnostyki *in vitro*. Zestaw ma charakter jakościowy: służy do potwierdzenia lub wykluczenia obecności wirusowego DNA w analizowanym preparacie.

Zasada działania

Zestaw **AmpliTest ASFV (Real Time PCR)** zawiera startery umożliwiające namnożenie fragmentu genomu wirusa ASF. Detekcja obecności wirusowego DNA następuje dzięki specyficznej sondzie typu TaqMan®, która przyłączając się do powstającego amplikonu (powielanego fragmentu wirusowego genomu), ulega hydrolizie. Podczas hydrolizy z sondy uwalniany jest barwnik fluorescencyjny FAM, który następnie wykrywany jest przez układ optyczny urządzenia do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR.

Odpowiednio dobrane sekwencje sondy i starterów zapewniają wysoką specyficzną reakcji. Układ sondy i starterów do wykrywania wirusa ASF jest oparty na metodzie referencyjnej opublikowanej przez King D.P. i wsp.: Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. J. Virol. Methods. 2003, 107, 53-61.

W celu zwiększenia wiarygodności wyników, zestaw **AmpliTest ASFV (Real Time PCR)** zawiera system kontroli wewnętrznej, w postaci układu sond i starterów służących do namnażania i detekcji sekwencji specyficznych dla genomowego DNA świni (genu kodującego aktywną). Detekcja świńskiego DNA odbywa się dzięki uwalnianiu przez sondę barwnika fluorescencyjnego HEX. Zastosowanie kontroli wewnętrznej pozwala na monitorowanie prawidłowego przebiegu reakcji Real Time PCR oraz umożliwia kontrolę dodania świńskiego genomowego DNA do reakcji. Układ sondy i starterów do amplifikacji kontroli wewnętrznej został zaczerpnięty z pracy Tignon Mi i wsp.: Development and inter-laboratory validation of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus. J. Virol. Methods. 2011, 178, 161-170.

POTRZEBNY SPRZĘT I DODATKOWE MATERIAŁY

Zestaw **AmpliTest ASFV (Real Time PCR)** umożliwia wykonanie kompletnej procedury diagnostycznej, polegającej na wykryciu obecności wirusa ASF w pobranych próbkach wyłącznie w połączeniu z zestawem do ekstrakcji DNA z pobranej próbki oraz urządzeniem do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR.

UWAGA 1. Zestaw **AmpliTest ASFV (Real Time PCR)** był walidowany na urządzeniach CFX96 (Bio-Rad) oraz LighCycler 480 (Roche). Zestaw jest kompatybilny z urządzeniami do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR posiadającymi możliwość detekcji barwników fluorescencyjnych HEX i FAM;

Pełną listę kompatybilnych urządzeń do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR można znaleźć na stronach internetowych producenta zestawu.

UWAGA 2. Zestaw **AmpliTest ASFV (Real Time PCR)** nie zawiera barwnika normalizacyjnego ROX. W przypadku urządzeń wymagających normalizacji, należy do składnika RM dodać barwnik ROX do odpowiedniego stężenia. Barwnik ROX nie jest dołączony do zestawu.

SPECYFIKACJA TECHNICZNA

Limit detekcji (LOD95)	3,75 genomów wirusa ASF/reakcję
Możliwość pulowania	Tak, do 10 preparatów DNA
Czułość diagnostyczna	Zestaw wykrywa wszystkie 23 opisane genotypy wirusa ASF.
Specyficzność diagnostyczna	Zestaw nie wykrywa sekwencji wirusów innych niż ASF i nie prowadzi do uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich dla preparatów genomowego DNA świń i dzików niezainfekowanych wirusa ASF.

EKSTRAKCJA DNA

Do ekstrakcji DNA zaleca się stosowanie zestawów opartych o złoża krzemionkowe (tzw. zestawów kolumnkowych), gdyż zapewniają one uzyskanie preparatów DNA o odpowiedniej jakości. Ilość wymaganego materiału zależy od użytej metody ekstrakcji DNA. Preparaty DNA należy przechowywać w 2-8°C (krótki okres przechowywania), w -20°C lub niższej temperaturze (długi okres przechowywania).

UWAGA 3. Próbkę do badań należy pobierać do sterylnych probówek. Przed procesem ekstrakcji DNA, próbki muszą być przechowywane w warunkach gwarantujących stabilność materiału genetycznego wykrywanego patogenu.

UWAGA 4. W przypadku stosowania innych metod ekstrakcji niż zestawy kolumnkowe, preparat DNA może zawierać związki, które istotnie zmniejszają wydajność reakcji PCR. Prowadzi to do obniżenia czułości testu, a w skrajnych przypadkach do braku amplifikacji DNA.

REAKCJA REAL TIME PCR

1. Określić liczbę preparatów DNA poddawanych analizie (**n**).
2. Rozmrozić składniki zestawu. Po rozmrożeniu, dokładnie wymieszać zawartość probówek i krótko je zwirować. **Składniki po rozmrożeniu przechowywać w 2-8°C lub na lodzie.**

UNIKAĆ EKSPOZYCJI SKŁADNIKA RM NA ŚWIATŁO.

3. Określić ilość preparatu DNA dodawanego do reakcji (**x** µL).

UWAGA 5. Optymalna ilość DNA dodawanego do reakcji wynosi do 400 ng. Duże ilości DNA dodawanego do reakcji PCR mogą hamować aktywność polimerazy DNA i obniżać czułość testu.

- 4.1. Dokładnie wymieszać ze sobą $(n + 3) \times 11$ µL składnika **RM** oraz $(n + 3) \times (9 - x)$ µL wody.
 - 4.2. Do **n + 2** probówek reakcyjnych nanieść po $(20 - x)$ µL przygotowanej mieszaniny.
 - 4.3. Do **n** probówek reakcyjnych dodać po **x** µL przygotowanych preparatów DNA. Do jednej z pozostałych dwóch probówek reakcyjnych dodać **x** µL składnika **NC** (kontrola negatywna), a do drugiej **x** µL składnika **PC** (kontrola pozytywna).
5. Zamknąć probówki reakcyjne, a następnie krótko je zwirować.
 6. Probówki reakcyjne umieścić w urządzeniu do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR i wykonać reakcję zgodnie z temperaturowym profilem reakcji.

Etap	Temperatura	Czas	Odczyt fluorescencji	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95°C	5 min		1
Denaturacja	95°C	10 s		} 45
Amplifikacja	62°C	40 s	FAM i HEX	

UWAGA 6. Zaleca się, aby czynności związane z nastawieniem reakcji Real Time PCR wykonywać w komorze laminarnej, celem ograniczenia ryzyka kontaminacji probówek reakcyjnych.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Prawidłowy wynik reakcji Real Time PCR przedstawiono w tabeli poniżej:

Rodzaj próbki	FAM	HEX	Wynik
Kontrola pozytywna	+	-	Prawidłowy
Kontrola negatywna	-	+	Prawidłowy
Oznaczenie 1	+	+	Dodatni
Oznaczenie 2	+	-	Dodatni
Oznaczenie 3	-	+	Ujemny

+ oznacza amplifikację produktu PCR rejestrowaną jako wzrost fluorescencji z $Cq \leq 40$

- oznacza brak amplifikacji produktu PCR i brak wzrostu fluorescencji lub wzrost fluorescencji z $Cq > 40$

Wynik określany jako **dodatni** potwierdza obecność sekwencji specyficznych dla wirusa ASF w badanej próbce. Wynik **ujemny** oznacza brak obecności lub obecność poniżej granicy wykrywalności, sekwencji specyficznych dla wirusa ASF w badanej próbce.

UWAGI DODATKOWE

- Zastosowane sondy TaqMan[®] posiadają tzw. ciemne wygaszacze (dark quenchers), które nie generują dodatkowych sygnałów fluorescencyjnych. W urządzeniach do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR, które tego wymagają (np. RotorGene 6000), jako typ wygaszacza należy wybrać opcję „none”.
- Urządzenie do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR powinno posiadać kalibrację (tzw. kompensację kolorów) dla barwników fluorescencyjnych wykorzystanych w zestawie.
- Zestaw **AmpliTest ASFV (Real Time PCR)** został zoptymalizowany do przeprowadzenia reakcji w objętości 20 μ L. Zmiana objętości reakcji może istotnie wpłynąć na niektóre parametry testu, w tym na osiągnięty limit detekcji.
- Zestaw **AmpliTest ASFV (Real Time PCR)** został zwalidowany według wytycznych EURL INIA.

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- Należy zachować szczególną ostrożność podczas ekstrakcji DNA. Materiał biologiczny uzyskany od zwierząt traktować jako **potencjalnie skażony** .
- Ekstrakcję DNA oraz detekcję obecności wirusa ASF powinien wykonać odpowiednio przeszkolony personel w laboratorium spełniającym odpowiednie wymogi i dopuszczonym do pracy z skażonym materiałem biologicznym. Należy zwrócić szczególną uwagę, aby podczas ekstrakcji DNA nie doszło do krzyżowego zanieczyszczenia preparatów DNA ekstrahowanych równolegle.
- W celu maksymalnego wyeliminowania fałszywych wyników należy przestrzegać następujących zasad:
 - w miarę możliwości wyznaczyć osobne stanowiska do ekstrakcji DNA, przygotowania reakcji Real Time PCR oraz jej wykonania/analizy;
 - zmieniać odzież ochronną (fartuch laboratoryjny, rękawice jednorazowe) pomiędzy etapami ekstrakcji DNA oraz przygotowania reakcji Real Time PCR;

- powierzchni stanowisk roboczych należy przemywać środkami usuwającymi/niszczącymi DNA;
 - należy stosować jedynie sterylne końcówki z filtrem dedykowane do pipet automatycznych;
 - podczas przygotowywania reakcji Real Time PCR, składnik **PC** należy dodać jako **ostatni**. Przed jego dodaniem, w miarę możliwości, należy zamknąć próbówki z dodanymi preparatami DNA i składnikiem **NC**;
- Podczas pracy z zestawem nie wolno jeść, pić, ani palić papierosów.
 - Należy umyć ręce bezpośrednio po zakończeniu pracy z zestawem.
 - W przypadku bezpośredniego kontaktu składników zestawu ze skórą lub oczami, należy przemyć te miejsca obficie wodą.
 - Zaleca się, aby zestawy z przekroczonym terminem ważności lub niewykorzystane składniki zestawu były utylizowane jak laboratoryjne odpady jednorazowego użytku.

ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW

Przebieg reakcji Real Time PCR

	Zaistniały problem		Prawdopodobna przyczyna	Rozwiązanie problemu
	FAM	HEX		
Nieprawidłowy odczyt fluorescencji dla kontroli pozytywnej	-	+	Dodano do próbówki reakcyjnej składnik NC zamiast PC .	Powtórzyć reakcję dla kontroli pozytywnej.
	-	-	Nie dodano składnika PC lub składnik RM jest złej jakości.	Powtórzyć reakcję dla kontroli pozytywnej. W przypadku otrzymania ponownie wyniku nieprawidłowego należy założyć złą jakość składnika RM (niewłaściwe przechowywanie, niewłaściwe warunki transportu, przekroczenie terminu ważności).
Nieprawidłowy odczyt fluorescencji dla kontroli negatywnej	+	+	Kontaminacja składnika RM lub NC .	Powtórzyć reakcję dla kontroli negatywnej. W przypadku otrzymania ponownie wyniku nieprawidłowego należy przyjąć, że doszło do kontaminacji składnika RM lub NC .
	+	-	Dodano do próbówki reakcyjnej składnik PC zamiast NC .	Powtórzyć reakcję dla kontroli negatywnej.
	-	-	Nie dodano składnika NC lub składnik RM jest złej jakości.	Powtórzyć reakcję dla kontroli negatywnej. W przypadku otrzymania ponownie wyniku nieprawidłowego należy przyjąć, że składnik RM jest złej jakości.

Zaistniały problem		Prawdopodobna przyczyna	Rozwiązanie problemu
FAM	HEX		
Nieprawidłowy odczyt fluorescencji dla badanej próbki	-	-	Niska wydajność ekstrakcji DNA i/lub obecne inhibitory reakcji Real Time PCR Zbyt duże stężenie preparatu DNA. Zła jakość składnika RM . Zmierzyć stężenie preparatu DNA i w razie konieczności powtórzyć reakcję z mniejszą ilością DNA dodanego do reakcji. Przy dalszym braku amplifikacji na kanale HEX dla badanych preparatów DNA oraz dla kontroli negatywnej założyć złą jakość składnika RM . Przy amplifikacji na kanale HEX dla kontroli negatywnej oraz braku amplifikacji na kanale HEX dla badanych preparatów DNA, założyć zanieczyszczenie preparatu DNA inhibitorami reakcji PCR lub niską wydajność ekstrakcji kwasów nukleinowych.

Proces ekstrakcji kwasów nukleinowych

Zaistniały problem	Prawdopodobna przyczyna	Rozwiązanie problemu
Wysokie wartości C_q uzyskiwane na kanale HEX dla badanych preparatów DNA ($C_q > 30$)	Niska wydajność ekstrakcji DNA z badanej próbki lub obecność inhibitorów w preparatach DNA	Niską wydajność ekstrakcji DNA można potwierdzić poprzez pomiar stężenia preparatów DNA. W przypadku prawidłowych stężeń DNA w preparatach (powyżej kilkunastu $ng/\mu L$) należy założyć obecność inhibitorów reakcji PCR w preparatach. W celu ustalenia przyczyn niskiej wydajności ekstrakcji DNA lub obecności w nich inhibitorów należy skontaktować się z producentem zastosowanego zestawu do ekstrakcji kwasów nukleinowych.

OBSŁUGA KLIENTA

- Wszelkie problemy i nieprawidłowości, które pojawiły się podczas użytkowania zestawu diagnostycznego można zgłaszać telefonicznie lub drogą mailową.
- Zamówienia na zestaw **AmpliTest ASFV (Real Time PCR)** można składać drogą mailową.

KONTAKT

Obsługa klienta, składanie zamówień

+48 739 223 268
contact@amplicon.pl