

# RealPCR\* ASFV DNA Test

## English Version

Real-time PCR detection of  
African swine fever virus DNA



## Version française

Détection de l'ADN du  
virus de la Peste Porcine Africaine par PCR en temps réel



## Versão em Português

PCR em tempo real para detecção de  
DNA do Vírus da Febre Suína Africana



## Versión Española

Detección de ADN del  
Virus de la Peste Porcina Africana por PCR en tiempo real



## Versione italiana

PCR in tempo reale per la rilevazione del  
DNA del virus della Peste Suina Africana



## Русская версия

Выявление ДНК возбудителя  
африканской чумы свиней методом ПЦР реального времени



## Wersja polska

Wykrywanie DNA wirusa  
afrykańskiego pomoru świń metodą PCR w czasie rzeczywistym



## Deutsche Version der Gebrauchsinformation

Zum Nachweis des Virus der  
afrikanischen Schweinepest DNA der mittels Real-Time PCR



## 中文版

非洲猪瘟病毒DNA实时定量PCR检测



**REF** 99-56020

 **Version**  
06-56020-04

*This insert is not for a product available to U.S. or Canadian customers.  
Please refer to the RealPCR insert webpage and select "United States  
or Canada" to view the correct product insert.*

Test With Confidence™

**IDEXX**





MENU



PRINT

English version

# RealPCR\* ASFV DNA Test

For veterinary use only

## Name and Intended Use

The RealPCR ASFV DNA Test is used for the detection of African swine fever virus (ASFV) DNA extracted from serum, plasma, EDTA-blood, oral fluids, tissue (lung, spleen, kidney, bone marrow, lymph nodes and tonsils) and swab samples from swine, including wild boars. Samples can be tested in pools of up to 20. Pools containing a single weak sample (for example, Ct > 32) may yield a negative result due to the dilution effect of pooling.

## General Information

African swine fever virus is the causative agent of haemorrhagic African swine fever. ASFV is a highly contagious agent, that with subclinical symptoms can persistently infect warthogs, bushpigs as well as *Onnithodoros* soft ticks. As a reportable disease to the World Health Organization for Animal Health (OIE), ASFV has a high morbidity and mortality in domestic swine. Controlling ASFV outbreaks relies heavily on early detection of the virus. The RealPCR ASFV DNA Test provides a highly sensitive and specific means to detect viral DNA.

The IDEXX RealPCR system is a modular format in which disease-specific target mixes are paired with a standardized DNA or RNA master mix and a single pooled positive control. Reagents are individually packaged and sold separately to allow for flexible reagent handling.

The RealPCR ASFV DNA Mix (ASFV DNA Mix) contains primers and probes for the detection of ASFV DNA when amplified with RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx). The internal control for the test is based on the detection of a genomic DNA sequence in the sample that is conserved in swine. This genomic target is referred to as the internal sample control (ISC) in this protocol. Detection of endogenous DNA in the test sample controls for sample addition, extraction and amplification. Primers and probe for detection of the internal sample control are included in the ASFV DNA Mix. An optional internal positive control, the RealPCR Internal Positive Control (IPC  $\geq$  v1.2), is also available and should be used when endogenous host DNA is at low levels or unlikely to be present after extraction (such as feed samples). The IPC contains a synthetic version of the swine ISC DNA target and is therefore compatible with the ASFV DNA Mix. Refer to the RealPCR Internal Positive Control ([REF](#) 99-56330) product insert for guidance.

## Materials and Storage

Identification/ General Information	Cap color	Quantity	Storage		Freeze/Thaw cycles
		100 tests	At receipt	After reconstitution	
<b>RealPCR ASFV DNA Mix (ASFV DNA Mix), dried</b>	Green	1 x 1.0 mL	-25 to 8°C	-25 to -15°C	≤6
<p><b>REF</b> 99-56020</p> <p>Reconstitute to 1 mL in PCR Grade Water. Store the ASFV DNA Mix in the dark. The expiration date on the vial is valid for either the dry or reconstituted form. The ASFV DNA Mix tube label indicates the PC version that is compatible with that target mix. For example, PC ≥ v1.4 means the target mix can be used with PC versions greater or equal to 1.4.</p>					
<b>RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx)</b>	Purple	1 x 1.0 mL	-25 to -15°C (Long-term)	N/A	≤6
<p><b>REF</b> 99-56250</p> <p>Concentrated master mix that includes hot-start polymerase for use with DNA target mixes in the IDEXX RealPCR system. The DNA MMx is more viscous than most master mixes– see the Test Procedure section for handling recommendations. A reference dye (ROX) has been added for normalizing volume inaccuracies. Protect the DNA MMx from light.</p>					
<b>RealPCR Positive Control, dried (PC)</b>	Blue	1 x 500 µL	-25 to 8°C	-25 to -15°C	≤6
<p><b>REF</b> 99-56310</p> <p>Reconstitute to 500 µL in PCR Grade Water. The PC contains all IDEXX RealPCR and ISC targets (including the target for ASFV) and is intended for use with all IDEXX RealPCR target mixes. The expiration date on the vial is valid for either the dry or reconstituted form. The PC has a version number (such as v1.3). When new target mixes are developed for the RealPCR product line, the target sequences are added to the PC and the PC version number increases (for example, v1.3 would be updated to v1.4).</p> <p>The PC includes the IDEXX Signature (a unique oligonucleotide sequence). Presence of the IDEXX Signature, in the work environment, indicates PC contamination. For laboratories that want to monitor for PC contamination, the IDEXX Signature can be detected using the RealPCR PC Tracker DNA Mix and RealPCR DNA MMx.</p>					
<b>RealPCR PCR Grade Water</b>	Clear	2 x 1.0 mL	-25 to 8°C		N/A
<p><b>REF</b> 99-56350</p> <p>PCR Grade Water has been qualified for reverse transcription-PCR (RT-PCR) use. It is used for the reconstitution of RealPCR reagents. It is also used as the PCR negative control for each test run. Do not transfer PCR Grade Water vials between PCR work areas. Separate vials of water are needed for each area to avoid contamination risk.</p>					

**Note:** See table at the end of the insert for a description of symbols used on the insert and labels.

## Materials Required but Not Provided

- Commercial DNA extraction kit
- Optional—Centrifuge with a rotor and adapters for multi-well plates
- Micro-centrifuge for 2 mL microtubes capable of reaching 1500 – 3000 x g
- Appropriate personal protective equipment (e.g., gloves, lab coat)
- Nuclease-free, aerosol-resistant pipette tips
- Sterile microtubes for preparation of PCR Mix
- Pipettes (5–1000  $\mu$ L); dedicated pipettes for preparation of PCR Mix
- 96- or 384-well format PCR plates and optical adhesive film/plate covers



- Real-time PCR instrument

(Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® 7500 Fast System (Standard and Fast Mode), 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 (72-Well Rotor only), Roche LightCycler® 480 or equivalent).

**Note-** the Roche LC480 instrument requires additional calibration and software settings.

IDEXX Technical Service can provide guidance for use of the instruments mentioned above with RealPCR reagents.

## Laboratory Practices and Warnings

- Do not use reagents past expiration date.
- The entire procedure must be performed under nuclease-free conditions.
- Wear powder-free gloves when working with the reagents and nucleic acids.
- To avoid cross-contamination, use nuclease-free, aerosol-resistant pipette tips for all pipetting, and physically separate the workplaces for nucleic acid extraction/handling, PCR setup and PCR.

## Reconstitution of Dried Components

Reconstitute the ASFV DNA Mix and Positive Control by pipetting PCR Grade Water to the volume indicated on the component label. Allow to sit at 18 to 26°C for at least 10 minutes; mix and microcentrifuge briefly prior to use. Once the ASFV DNA Mix and the Positive Control are reconstituted, aliquot as appropriate and store the solutions frozen. When handling frozen components, thaw at 18 to 26°C for approximately 15 to 30 minutes, mix gently and then microcentrifuge briefly (~1,500 – 3,000  $\times$  g).



## DNA Extraction

The ASFV DNA Mix has been validated using the commercial extraction methods listed below. Other extraction or lysis methods may also be used once validated by the laboratory.

RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX)  
RealPCR DNA/RNA Spin Column Kit (IDEXX)  
MagMAX Pure- 96 Viral RNA Isolation Kit (Thermo)  
QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)  
High Pure PCR Template Prep Kit (Roche)

Store the purified DNA at  $\leq -15^{\circ}\text{C}$  if testing is not performed immediately after DNA extraction. It is recommended that a negative extraction control (mock sample) is included as a sample.

## Test Procedure

- 1 Preparation of the PCR Mix.
  - Mix the thawed DNA MMx by inversion or gentle vortex.
  - The DNA MMx is a viscous solution; always pipette it slowly.
  - To prepare the PCR Mix add 10  $\mu$ L ASFV DNA Mix and 10  $\mu$ L DNA MMx for each reaction.
  - When preparing the PCR Mix, first pipette ASFV DNA Mix into the tube and then add the DNA MMx. Pipette up and down a few times to rinse the MMx pipette tip.
  - Gently vortex the solution to ensure the components are mixed well.
  - Pipette the PCR Mix slowly into the PCR plate.

The PCR Mix can be stored at 2 to 8°C for up to 24 hrs or –25 to –15°C for up to 2 weeks. Protect from light.

- 2 Pipette 20  $\mu$ L of the PCR Mix into the required wells of the multiwell plate.
- 3 Add 5  $\mu$ L of sample DNA to each well. The final reaction volume is 25  $\mu$ L.
- 4 Include the Positive Control (5  $\mu$ L) and PCR negative control (5  $\mu$ L PCR Grade Water) for each test run.
- 5 Cover the plate and briefly spin the plate, if necessary, to settle contents and remove air bubbles.
- 6 Set up thermal cycler with IDEXX RealPCR Standard DNA/RNA Cycling Program.

### Settings for Reporter and Quencher

Target	Reporter	Quencher
ASFV	FAM™	BHQ® (none)
Internal Control (ISC/IPC)	HEX™ (VIC)	BHQ (none)
Passive Reference	ROX™	N/A

### RealPCR\* Standard DNA/RNA Cycling Program

	Temperature	Time	Cycles
Reverse transcription (RT)	50°C	15 min.	1
Denaturation	95°C	1 min.	1
Amplification**	95°C	15 sec.	45
	60°C	30 sec.	

\*\*Ensure the instrument is set to record fluorescence following the 60°C amplification step.

**Note-** for DNA targets, the cycling protocol can be run without the RNA "RT" step. However it is recommended that the "RT" step is used routinely so that RNA tests can easily be incorporated into the work-flow.

---

## 7 Analyze data

When setting up the instrument software, assign a unique identifier to each target and internal control. For example, when target A and B are on the same plate, the A wells must be analyzed independently from the B wells. Refer to specific instrument's user manual for guidance on how to analyze data. To set the threshold, use the Auto Ct setting.

- Agilent Mx3000P and Mx3005P– ensure the background-based threshold fluorescence method is being used for analysis.
- QIAGEN Rotor-Gene instrument– manually adjust the threshold line above background in the linear phase of exponential amplification. This is best done on log view plots and should be repeated for each reporter in the target mix.
- Applied Biosystems instruments– In certain situations the auto threshold setting does not produce satisfactory results. In these situations, a manual adjustment of the threshold is necessary to determine Ct values. This is best done on log view plots and should be repeated for each reporter in the target mix.

### Validity Criteria

	<u>FAM Ct value</u>	<u>HEX (VIC) Ct value</u>
Positive Control	<38	<38
PCR Negative Control	No Signal	No Signal

---

## 8 Interpretation of results

<u>Sample Result</u>	<u>FAM Signal</u>	<u>HEX (VIC) Signal</u>	<u>Other characteristics</u>
ASFV DNA detected	Yes	Yes/No	A positive Ct value and characteristic amplification curve in comparison to the PCR negative control. An internal control amplification curve in the HEX (VIC) channel is expected; some strong ASFV-positive DNA samples may result in a negative internal control result. <sup>†</sup>
ASFV DNA not detected	No	Yes	Amplification curve in the HEX (VIC) internal control channel.
Invalid <sup>‡</sup>	No	No	Absence of an amplification curve in the FAM and HEX (VIC) channels indicates an invalid result.

<sup>†</sup>The target mix is optimized for the detection of ASFV DNA; a strong positive DNA sample may out compete the detection of the internal control.

<sup>‡</sup>An invalid sample can be an indication of failed sample addition, extraction and/or PCR. It is recommended that the DNA be diluted five-fold into PCR grade water and retested; include the undiluted DNA as a sample. If the test is still not valid a new extraction is recommended.

**For technical assistance:**

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 or +1 207 556 4895

IDEXX Europe Tel: +800 727 43399

Contact your IDEXX area manager or distributor or visit our website: [idexx.com/contact/pd](https://idexx.com/contact/pd)

\*IDEXX, RealPCR and Test With Confidence are trademarks or registered trademarks of IDEXX Laboratories or its affiliates in the United States and/or other countries. All other product and company names and logos are trademarks of their respective holders.

Dye compounds in this product are sold under license from Biosearch Technologies, Inc. and protected by U.S. and world-wide patents either issued or in application. The license covers veterinary applications. Not for human IVD use.

Patent information: [idexx.com/patents](https://idexx.com/patents)

©2022 IDEXX Laboratories, Inc. All rights reserved.





MENU



IMPRIMER

Version française

## RealPCR\* ASFV DNA Test

Réservé à l'usage vétérinaire

### Nom et utilisation prévue

Le RealPCR ASFV DNA Test est utilisé pour la détection de l'ADN du virus de la peste porcine africaine (African Swine Fever Virus, ASFV) dans le sérum, le plasma, le sang (EDTA), les fluides oraux, les tissus (poumons, rate, reins, moelle osseuse, ganglions lymphatiques et amygdales) et les écouvillons provenant de porcs, y compris les sangliers. Les échantillons peuvent être analysés en mélanges de maximum 20 échantillons individuels. Les mélanges contenant un échantillon faiblement positive (par exemple Ct > 32) peuvent donner un résultat négatif dû à l'effet de dilution dans le mélange.

### Informations générales

Le virus de la peste porcine africaine est l'agent causal de la peste porcine africaine hémorragique. L'ASFV est un agent très contagieux qui, même avec des symptômes subcliniques, peut occasionner une infection persistante chez le phacochère, le potamochère ainsi que la tique molle *Ornithodoros*. Maladie à déclaration obligatoire auprès de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE), l'ASFV est une cause de morbidité et de mortalité élevées chez le porc domestique. Le contrôle des épidémies d'ASFV repose en grande partie sur une détection précoce du virus. Le RealPCR ASFV DNA Test offre un moyen très sensible et spécifique pour détecter l'ADN viral.

Le système IDEXX RealPCR a un format modulaire dans lequel chaque mix maladie/cible spécifique est associé au master mix DNA ou RNA et au contrôle positif commun. Les réactifs sont conditionnés individuellement et vendus séparément pour une gestion flexible des réactifs.

Le RealPCR ASFV DNA Mix (ASFV DNA Mix) contient les amorces et les sondes pour la détection de l'ADN de ASFV amplifié avec le RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx). Le contrôle interne du test, appelé Internal Sample Control (ISC), est basé sur la détection d'une séquence d'ADN génomique, conservée dans les échantillons porcins. La détection de cet ADN endogène contrôle l'ajout, l'extraction et l'amplification de l'échantillon. Les amorces et sonde de l'ISC sont incluses dans le ASFV DNA Mix. Un contrôle positif interne exogène facultatif, le RealPCR Internal Positive Control (IPC  $\geq$  v1.2), est également disponible et doit être utilisé lorsque l'ADN hôte endogène est à des niveaux faibles ou est peu susceptible d'être présent après l'extraction (échantillons d'aliments pour animaux par exemple). L'IPC contient une version synthétique de l'ADN cible porcine correspondant à l'ISC et est donc compatible avec le ASFV DNA Mix. Consulter le mode d'emploi du RealPCR Internal Positive Control ([REFI 99-56330](#)) pour plus d'information.

## Matériel et conservation

Identification/ Informations générales	Couleur du bouchon	Quantité	Conservation		Cycles de congélation/ décongélation
		100 tests	À réception	Après reconstitution	
<b>RealPCR ASFV DNA Mix (ASFV DNA Mix), déshydraté</b>	Vert	1 x 1,0 ml	-25 à 8°C	-25 à -15°C	≤6
<p><b>[REF]</b> 99-56020</p> <p>A reconstituer avec 1 ml d'eau de qualité PCR. Conserver le ASFV DNA Mix à l'abri de la lumière. La date d'expiration mentionnée sur l'étiquette du flacon est valable aussi bien pour la forme « déshydratée » que « reconstituée ». La version du Positive Control (PC) qui est compatible avec ce mix cible est également indiquée sur l'étiquette. Par exemple, PC ≥ 1.4 signifie que le mix cible peut être utilisé avec toute version de PC dont la version est supérieure ou égale à 1.4.</p>					
<b>RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx)</b>	Violet	1 x 1,0 ml	-25 à -15°C (long terme)	NA	≤6
<p><b>[REF]</b> 99-56250</p> <p>Master Mix concentré incluant et la polymérase à activer par la chaleur pour une utilisation avec les DNA mixés cibles du système IDEXX RealPCR. Le DNA MMx est plus visqueux que la plupart des master mixes. Voir la section Mode opératoire pour consulter les recommandations relatives à la manipulation. Un fluorophore de référence (ROX) a été ajouté afin de normaliser les imprécisions en terme de volume. Protéger le DNA MMx de la lumière.</p>					
<b>RealPCR Positive Control (PC), déshydraté</b>	Bleu	1 x 500 µl	-25 à 8°C	-25 à -15°C	≤6
<p><b>[REF]</b> 99-56310</p> <p>A reconstituer avec 500 µl d'eau de qualité PCR. Le PC contient toutes les cibles IDEXX RealPCR et ISC (y compris les cibles pour ASFV) et est destiné à être utilisé avec tous les mixes cibles IDEXX RealPCR. La date d'expiration mentionnée sur l'étiquette du flacon est valable aussi bien pour la forme « déshydratée » que « reconstituée ». Le PC porte un numéro de version ("v1.3" par exemple). Lorsque de nouveaux mixes cibles RealPCR sont développés, les nouvelles séquences cibles sont ajoutées au PC et le numéro de version de celui-ci est incrémenté (par exemple "v1.3" sera mis à jour et deviendra "v1.4").</p> <p>Le contrôle positif (PC) contient la séquence IDEXX Signature (séquence d'oligonucléotide unique). La présence de la séquence IDEXX Signature dans l'environnement de travail indique une contamination par le contrôle positif (PC). Les laboratoires souhaitant surveiller la contamination par le contrôle positif (PC) peuvent détecter la séquence IDEXX Signature en utilisant le mix cible RealPCR PC Tracker DNA Mix et le RealPCR DNA MMx.</p>					
<b>RealPCR PCR Grade Water</b>	Translucide	2 x 1,0 ml	-25 à 8°C		NA
<p><b>[REF]</b> 99-56350</p> <p>L'eau de qualité PCR est qualifiée pour être utilisée pour la transcription-PCR inverse (RT-PCR). Elle est utilisée pour la reconstitution des réactifs RealPCR. Elle est également utilisée en tant que Contrôle Négatif PCR pour chaque run. Ne pas déplacer les tubes d'eau PCR entre les espaces de travail PCR. La séparation des tubes d'eau est nécessaire afin d'éviter les risques de contamination.</p>					

**Remarque:** voir le tableau à la fin du mode d'emploi pour la description des symboles utilisés dans ce mode d'emploi et sur les étiquettes.

## Matériel nécessaire mais non fourni

- Kit commercial d'extraction de l'ADN
  - Facultatif: centrifugeuse avec un rotor et des adaptateurs pour les plaques multipuits
  - Microcentrifugeuse pour les microtubes de 2 ml (capacité: 1500 – 3000 x g)
  - Équipement de protection individuel adéquat (ex: gants, blouse de laboratoire)
  - Embouts de pipettes nuclease-free avec filtre anti-aérosols
  - Microtubes stériles pour la préparation du mélange PCR
  - Pipettes (5 à 1 000 µl) dédiées à la préparation du mélange PCR
  - Plaques PCR de 96 ou 384 puits et film adhésif optique/couvercles de plaque
  - Thermocycleur PCR en temps réel  
(Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® 7500 Fast System (Standard et Fast Mode), 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 (Rotor 72 puits uniquement), Roche LightCycler® 480 ou équivalent).
- Remarque:** le thermocycleur Roche LC480 et son logiciel requièrent des paramètres complémentaires. Le Service Technique IDEXX peut fournir l'assistance nécessaire pour l'utilisation des instruments mentionnés ci-dessus avec les réactifs IDEXX RealPCR.

## Pratiques de laboratoires et avertissements

- Ne pas utiliser les réactifs après la date d'expiration.
- La procédure complète doit être réalisée dans des conditions "nuclease-free".
- Porter des gants sans poudre lors de la manipulation des réactifs et des acides nucléiques.
- Pour éviter toute contamination croisée, utiliser des embouts de pipette nuclease-free avec filtre anti-aérosols pour tout pipetage. Séparer physiquement les espaces de travail pour l'extraction et la manipulation des acides nucléiques ainsi que pour la préparation et la réalisation du test PCR.

## Reconstitution des composants déshydratés

Reconstituer le ASFV DNA Mix et le PC avec l'eau de qualité PCR au volume indiqué sur l'étiquette du composant. Laisser reposer à une température de 18 à 26°C pendant au moins 10 minutes; mélanger et passer brièvement à la microcentrifugeuse avant utilisation. Lorsque le ASFV DNA Mix et le PC sont reconstitués, aliquoter et congeler les solutions si besoin. Pour les composants congelés, décongeler à une température de 18 à 26°C pendant environ 15 à 30 minutes et mélanger délicatement, puis passer brièvement à la microcentrifugeuse (~1 500 – 3 000 x g).

## Extraction de l'ADN

Le ASFV DNA Mix a été validé à l'aide des méthodes d'extraction commerciales indiquées ci-dessous. D'autres méthodes d'extraction ou procédures de lyse peuvent être utilisées dans la mesure où elles sont validées par le laboratoire.

RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX)  
RealPCR DNA/RNA Spin Column Kit (IDEXX)  
MagMAX Pure- 96 Viral RNA Isolation Kit (Thermo)  
QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)  
High Pure PCR Template Prep Kit (Roche)

Conserver l'ADN purifié à une température inférieure à <-15°C si le test n'est pas effectué immédiatement après extraction. Il est recommandé qu'un contrôle négatif d'extraction (échantillon blanc) soit inclus comme échantillon.

## Mode opératoire

### 1 Préparation du mélange PCR.

- Mélanger le DNA MMx décongelé par inversions répétées ou en l'agitant délicatement.
- Le DNA MMx est une solution visqueuse; toujours la prélever lentement.
- Pipetter 10 µl de ASFV DNA Mix et 10 µl de DNA MMx pour chaque réaction.
- Lors de la préparation du mélange PCR, ajouter d'abord du ASFV DNA Mix dans le tube, puis ajouter le DNA MMx. Rincer plusieurs fois la pointe de la pipette par aspiration-refoulement.
- Retourner ou remuer délicatement la solution pour vérifier que les composants sont bien mélangés.
- Distribuer le mélange PCR lentement dans la plaque PCR.

Le mélange PCR peut être conservé entre 2 à 8°C jusqu'à 24 heures ou entre -25 à -15°C jusqu'à 2 semaines. Protéger de la lumière.

### 2 Distribuer 20 µl de mélange PCR dans les puits requis de la plaque multipuits.

### 3 Distribuer 5 µl d'échantillon d'ADN par puits. Le volume final de la réaction est de 25 µl.

### 4 Distribuer 5 µl de PC et 5 µl de Contrôle Négatif PCR (eau de qualité PCR) pour chaque run.

### 5 Couvrir la plaque et la centrifuger brièvement si nécessaire pour éliminer les bulles d'air.

### 6 Programmer le thermocycleur à l'aide des paramètres standards IDEXX RealPCR DNA/RNA.

#### Paramètres pour le Reporter (marqueur) et le Quencher (extincteur)

Cible	Reporter	Quencher
ASFV	FAM™	BHQ® (aucun)
Contrôle Interne (ISC/IPC)	HEX™ (VIC)	BHQ (aucun)
Référence passive	ROX™	NA

#### Programme standard des cycles de températures pour les réactifs IDEXX RealPCR DNA/RNA

	Température	Durée	Cycles
Transcription inverse (RT)	50°C	15 min.	1
Dénaturation	95°C	1 min.	1
Amplification**	95°C	15 s.	45
	60°C	30 s.	

\*\*Vérifier que l'appareil est paramétré pour enregistrer la fluorescence après l'étape d'amplification à 60°C.

**Remarque:** Il est recommandé d'exécuter systématiquement l'intégralité du programme d'amplification quel que soit la nature de la cible, ADN ou ARN. Cependant, il est possible de s'affranchir de l'étape "RT" pour les cibles ADN.

## 7 Analyser les données.

Lors du paramétrage du logiciel du thermocycleur, attribuer un identifiant unique à chaque cible ainsi qu'au contrôle interne. Par exemple, si les cibles A et B sont testées sur une même plaque, les puits A doivent être analysés séparément des puits B. Se reporter au manuel de l'utilisateur du thermocycleur sur la façon d'analyser les données. Utiliser la fonction "Auto Ct" pour déterminer la valeur seuil.

- Sur les thermocycleurs Agilent modèles MX 3000P et MX3005P, sélectionner la fonction "background-based threshold" pour l'analyse des résultats.
- Pour le thermocycleur QIAGEN Rotor-Gene, ajuster manuellement le seuil au-dessus du bruit de fond dans la phase linéaire de l'amplification exponentielle. Il est préférable de le faire sur des courbes avec affichage logarithmique, et cet ajustement est requis pour chacun des « reporter » du mix cible.
- Pour les thermocycleurs Applied Biosystems: dans certains cas, l'ajustement automatique du seuil ne permet pas d'obtenir des résultats satisfaisants. Un ajustement manuel du seuil est alors nécessaire pour déterminer les valeurs de Ct. Il est préférable de le faire sur des courbes avec affichage logarithmique, et cet ajustement est requis pour chacun des « reporter » du mix cible.

### Critères de validité

	Valeur de Ct FAM	Valeur de Ct HEX (VIC)
Contrôle Positif	<38	<38
Contrôle Négatif PCR	Aucun signal	Aucun signal

## 8 Interprétation des résultats

Résultat de l'échantillon	Signal FAM	Signal HEX (VIC)	Autres caractéristiques
ADN ASFV détecté	Oui	Oui/Non	Une valeur de Ct positive et une courbe d'amplification caractéristique par rapport au Contrôle Négatif PCR. Une courbe d'amplification pour le contrôle interne dans le canal HEX (VIC) est attendue. Cependant, certains échantillons d'ADN fortement positifs au ASFV peuvent donner lieu à un résultat contrôle interne négatif. <sup>†</sup>
ADN ASFV non-détecté	Non	Oui	Courbe d'amplification dans le canal HEX (VIC) pour le contrôle interne.
Non valide <sup>‡</sup>	Non	Non	L'absence de courbe d'amplification dans les canaux FAM et HEX(VIC) indique un résultat non-valide.

<sup>†</sup>Le mix cible spécifique est optimisé pour la détection de l'ADN de ASFV; un échantillon d'ADN fortement positif peut empêcher la détection du contrôle interne.

<sup>‡</sup>Un résultat non valide peut indiquer un problème lors de l'ajout de l'échantillon, de l'extraction et/ou pendant la PCR. Il est recommandé de diluer l'ADN au 1/5 avec de l'eau de qualité PCR avant de refaire le test et d'inclure l'ADN non-dilué comme échantillon distinct. Si le résultat du test est toujours invalide, procéder à une nouvelle extraction.

**Pour l'assistance technique:**

IDEXX É.-U. Tél.: +1 800 548 9997 ou +1 207 556 4895

IDEXX Europe Tél.: +800 727 43399

Contactez votre responsable de secteur IDEXX, votre distributeur ou  
visitez notre site web: [idexx.com/contactipd](http://idexx.com/contactipd)

\*IDEXX, RealPCR et Test With Confidence sont des marques commerciales ou des marques déposées d'IDEXX Laboratories ou de ses filiales aux États-Unis et/ou dans d'autres pays. Tous les autres logos, noms de produits et de sociétés sont des marques de leur détenteur respectif.

Les composants fluorophores dans ce produit sont commercialisés sous licence de Biosearch Technologies, Inc. et protégés par les brevets américains et internationaux émis ou en application. L'octroi de licence couvre les applications vétérinaires. Ne s'applique pas aux utilisations dans le domaine IVD humain.

Informations sur les brevets: [idexx.com/patents](http://idexx.com/patents)

©2022 IDEXX Laboratories, Inc. Tous droits réservés.



MENU



IMPRIMIR

Versão em Português

# RealPCR\* ASFV DNA Test

Para uso exclusivamente veterinário

## Nome e uso pretendido

O RealPCR ASFV DNA Test é usado para a detecção de DNA do vírus da peste suína africana (ASFV) extraído do soro, plasma, sangue EDTA, fluidos orais, tecidos (pulmão, baço, rim, medula óssea, linfonodos e amígdalas) e swabs de amostras dos suínos, incluindo javalis. As amostras podem ser testadas em pools de até 20. Pools contendo uma única amostra fraca (por exemplo, Ct > 32) podem produzir um resultado negativo devido ao efeito de diluição do agrupamento.

## Informações gerais

O vírus da peste suína africana é o agente causador da febre hemorrágica da peste suína africana. O ASFV é um agente altamente contagioso, que com sintomas subclínicos pode infectar persistentemente javalis, porcos do mato, bem como carrapatos moles *Onirithodoros*. Como é uma doença de notificação à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), o ASFV tem uma alta taxa de morbidade e mortalidade em suínos domésticos. O controle de surtos de ASFV baseia-se fortemente na detecção precoce do vírus. O RealPCR ASFV DNA Test fornece um meio altamente sensível e específico para detectar o DNA viral.

O sistema IDEXX RealPCR possui um formato modular específico por enfermidades onde as misturas dos alvos são emparelhados com um DNA padronizado ou mistura principal de RNA e um único pool de controle positivo. Os reagentes são embalados e vendidos separadamente para permitir a manipulação do reagente de forma flexível e individualmente.

O RealPCR ASFV DNA Mix (ASFV DNA Mix) contém primers e sondas para detecção do DNA do ASFV após amplificação com o RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx). O controle interno do teste é baseado na detecção da sequência genômica do DNA de amostra de suínos conservadas. O alvo genômico neste protocolo se refere ao controle interno positivo (ISC). A Detecção do DNA endógeno se dá no controle das amostras adicionadas, extraídas e amplificadas. Os primers e a sonda para a detecção do controle interno da amostra estão incluídos no ASFV DNA Mix. Um controle positivo interno opcional, o RealPCR Internal Positive Control (IPC  $\geq$  v1.2), também está disponível e deve ser utilizado quando o DNA do hospedeiro endógeno está em níveis baixos ou sua probabilidade de estar presente após a extração é pequena (como amostras de ração). O IPC contém uma versão sintética do ISC DNA de suínos, compatível com o ASFV DNA Mix. Consulte o folheto informativo do RealPCR Internal Positive Control para [\(REF\) 99-56330](#) orientação.

## Materiais e armazenamento

Identificação/ Informações gerais	Cor da tampa	Quantidade	Armazenamento		Ciclos de congelamento/ descongelamento
		100 testes	No recebimento	Após a reconstituição	
<b>RealPCR ASFV DNA Mix (ASFV DNA Mix), liofilizado</b>	Verde	1 x 1,0 ml	-25 a 8°C	-25 a -15°C	≤6
<p><b>REF</b> 99-56020</p> <p>Reconstituir com 1 ml de água grau PCR. Guarde o ASFV DNA Mix no escuro. A data de validade no frasco é válido tanto para a forma liofilizada ou reconstituída. A etiqueta do tubo de ASFV DNA Mix indica a versão PC que é compatível com o mix de alvo. Por exemplo, PC ≥ v1.4 significa que a mix de alvo pode ser utilizada com as versões maiores do que 1.4.</p>					
<b>RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx)</b>	Roxo	1 x 1,0 ml	-25 a -15°C (em longo prazo)	N/A	≤6
<p><b>REF</b> 99-56250</p> <p>O concentrado master mix inclui polimerase hot-start para uso com o mixes de alvos do IDEXX RealPCR System. O DNA MMx é mais viscoso que a maioria dos master mix– consulte a seção Procedimento de teste para conhecer as recomendações de manuseio. Um corante de referência (ROX) foi adicionado para normalizar imprecisões de volume. Proteja o DNA MMx da luz.</p>					
<b>RealPCR Positive Control, liofilizado (PC)</b>	Azul	1 x 500 µl	-25 a 8°C	-25 a -15°C	≤6
<p><b>REF</b> 99-56310</p> <p>Reconstituir com 500 µl em água grau PCR. O PC contém todos os alvos da IDEXX RealPCR e ISC (incluindo os alvos para ASFV) e é previsto para ser usado com todos os testes IDEXX RealPCR mix de alvo. A data de validade mostrada no frasco serve para a forma liofilizada ou reconstituída. O PC tem um número de versão (tal como v1.3). Quando novos mixes de alvo são desenvolvidos para a linha de produtos RealPCR, as sequências alvo são adicionadas ao PC e o número da versão PC aumenta (por exemplo, v1.3 seria atualizado para v1.4).</p> <p>O PC inclui a assinatura IDEXX (uma sequência única de oligonucleotídeos). A presença da Assinatura IDEXX no ambiente de trabalho, indica contaminação pelo PC. Para os laboratórios que desejam monitorar a contaminação pelo PC, a Assinatura IDEXX pode ser detectada usando o RealPCR PC Tracker DNA Mix e o RealPCR DNA MMx.</p>					
<b>RealPCR PCR Grade Water</b>	transparente	2 x 1,0 ml	-25 a 8°C		N/A
<p><b>REF</b> 99-56350</p> <p>A água de grau PCR é a qualificada para o uso com o PCR por transcriptase reversa (RT-PCR). Ela é usada para reconstituir os reagentes do RealPCR. Também é usada como controle negativo de PCR para cada teste realizado. Não transfira frascos de água de qualidade para PCR entre áreas de trabalho de PCR. São necessários frascos de água separados para cada área para evitar o risco de contaminação.</p>					

**Nota:** ver a tabela no final do inserte para uma descrição dos símbolos utilizados na inserte e nos rótulos.



## Materiais necessários, mas não fornecidos

- Kit comercial de extração de DNA
- Opcional-Centrífuga com um rotor e adaptadores para placas multipoços
- Microcentrifuga para microtubos de 2 ml com capacidade de 1500 – 3000 x g
- Equipamento de proteção individual adequado (p. ex., luvas, jalecos)
- Ponteiras livres de nuclease e resistentes a aerossóis
- Microtubos estéreis para preparação do Mix PCR
- Pipetas com volumes de 5–1000  $\mu$ l; Pipetas dedicadas para preparação do Mix PCR
- Placas de PCR no formato 96 ou 384 e filme óptico/tampas de placas
- 👁️ • Instrumento de PCR em tempo real  
(Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® 7500 Fast System (Standard e Fast Mode), 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 (apenas rotor de 72 poços), Roche LightCycler® 480 ou equivalente).  
**Nota-** o instrumento Roche LC480 requer calibração adicional e ajustes no software.  
O suporte técnico da IDEXX poderá fornecer orientações para o uso dos instrumentos mencionados acima com reagentes RealPCR.

## Práticas laboratoriais e advertências

- Não use os reagentes após a data de validade.
- Todo o procedimento deve ser realizado sob condições isentas de nuclease.
- Use luvas sem talco ao trabalhar com os reagentes e ácidos nucleicos.
- Para evitar contaminação cruzada, utilize ponteiras livres de nuclease e resistentes a aerossóis para pipetar e separe fisicamente os locais de trabalho para a extração/manuseio de ácido nucleico, configuração da PCR e a reação de PCR.

## Reconstituição de componentes secos

Reconstitua o ASFV DNA Mix e o PC pipetando água de qualidade PCR para o volume indicado no rótulo do componente. Deixe em repouso entre 18 e 26°C por pelo menos 10 minutos; misture e microcentrifugue rapidamente antes do uso. Assim que o ASFV DNA Mix e o PC estiverem reconstituídos, divida adequadamente e congele as soluções. Ao manusear componentes congelados, descongele entre 18 e 26°C por 15 a 30 minutos, misture cuidadosamente e microcentrifugue rapidamente (~1.500 – 3.000 x g).

## 👁️ Extração de DNA

O ASFV DNA Mix foi validado usando os métodos de extração comercial mostrados abaixo. Outros métodos de extração ou lise também podem ser usados, uma vez que sejam validados pelo laboratório.

RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX)  
RealPCR DNA/RNA Spin Column Kit (IDEXX)  
MagMAX Pure- 96 Viral RNA Isolation Kit (Thermo)  
QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)  
High Pure PCR Template Prep Kit (Roche)

Armazene o DNA purificado a  $<-15^{\circ}\text{C}$  se o teste não for realizado imediatamente após a extração do DNA. Recomenda-se que um controle negativo de extração (amostra simulada) seja incluído como amostra.

## Teste Procedimento

### 1 Preparação do Mix PCR.

- Misture o DNA MMx descongelado por inversão ou vortex em baixa rotação de maneira suave.
- O DNA MMx é uma solução viscosa; sempre pipete lentamente.
- Para preparar a mistura de PCR adicione 10  $\mu$ l ASFV DNA Mix e 10  $\mu$ l do DNA MMx para cada reação.
- Ao preparar o PCR Mix, primeiro pipete ASFV DNA Mix no tubo e, em seguida, adicione o DNA MMx. Pipete algumas vezes para lavar a ponta de pipeta do MMx.
- Homogenize de forma cuidadosa usando o vortex em baixa rotação a solução para garantir que os componentes estejam bem misturados.
- Pipetar a mistura de PCR lentamente na placa de PCR.

O mix de PCR pode ser armazenado de 2 a 8°C por até 24 horas ou -25°C a -15°C por até 2 semanas. Proteja-o da luz.

### 2 Pipetar 20 $\mu$ l do Mix de PCR para os poços necessários da placa.

### 3 Adicione 5 $\mu$ l de amostra de DNA a cada poço. O volume da reação final é de 25 $\mu$ l.

### 4 Adicione o PC (5 $\mu$ l) e o controle negativo de PCR (5 $\mu$ l de água grau PCR) para cada teste realizado.

### 5 Cubra a placa com a tampa. Gire cuidadosamente a placa, se necessário, para acomodar o conteúdo e remover bolhas de ar.

### 6 Configure o termociclador com o programa padrão de ciclagem da IDEXX RealPCR Padrão DNA/RNA.

#### Configurações para reporter e quencher

<u>Alvo</u>	<u>Reporter</u>	<u>Quencher</u>
ASFV	FAM™	BHQ® (nenhum)
Controle Interno (ISC/IPC)	HEX™ (VIC)	BHQ (nenhum)
Referência passiva	ROX™	N/A

#### Programa Padrão de Ciclagem de DNA/RNA do RealPCR

	<u>Temperatura</u>	<u>Tempo</u>	<u>Ciclos</u>
Transcription Reversa (RT)	50°C	15 min.	1
Desnaturação	95°C	1 min.	1
Amplificação**	95°C	15 seg	45
	60°C	30 seg	

\*\*Certifique-se de que o instrumento esteja configurado para registrar fluorescência após a etapa de amplificação de 60°C.

**Note-** para alvos de DNA, o protocolo de ciclagem pode ser executado sem o passo "RT". No entanto, recomenda-se que o passo de "RT" seja utilizado rotineiramente para que os testes de RNA possam ser facilmente incorporados no fluxo de trabalho.

## 7 Análise os dados

Ao configurar o software do aparelho, atribuir um identificador único para cada alvo controle interno. Por Exemplo, quando o alvo A e B estão em uma única placa, os poços da cavidade A devem ser analisados independentemente das cavidades do B. Consulte o manual do usuário do instrumento específico para obter orientação sobre como analisar os dados. Para estabelecer o limiar de fluorescência (threshold), use a configuração Auto Ct (Auto threshold cycle - Ciclo de limiar automático).

- No Agilent Mx3000P e Mx3005P, certifique-se que esteja sendo usado para análise o método "background-based threshold".
- Para o instrumento QIAGEN Rotor-Gene, ajuste manualmente a linha limiar acima do valor de fundo na fase linear de amplificação exponencial. A melhor forma de se proceder é por meio de gráficos de logarítmicos, e é necessário para cada relato da mistura alvo.
- Instrumentos da Applied Biosystems— Em determinadas situações, a configuração automática do limite não produz resultados satisfatórios. Nessas situações, um ajuste manual do limite é necessário para determinar os valores de Ct. Isso é feito melhor em plotagens de exibição de log e deve ser repetido para cada repórter no mix de destino.

### CrITÉRIOS de validade

	FAM valor Ct	HEX (VIC) valor Ct
Controle de PCR Positivo	<38	<38
Controle de PCR negativo	Nenhum sinal	Nenhum sinal

## 8 Interpretação dos resultados

<u>Resultado da amostra</u>	<u>FAM (sinal)</u>	<u>HEX (VIC) sinal</u>	<u>Outras características</u>
DNA ASFV detectado	Sim	Sim/Não	O valor de Ct positivo e a característica da curva de amplificação em comparação com o controle negativo da PCR. É esperada uma curva de amplificação de controle interno no canal HEX(VIC); algumas amostras fortes positivas de DNA ASFV pode resultar em um resultado negativo de controle interno.†
DNA ASFV não detectado	Não	Sim	Curva de amplificação do controle interno no canal HEX (VIC).
Inválida‡	Não	Não	Ausência de uma curva de amplificação nos canais FAM e HEX (VIC) indicam um resultado inválido.

†O mix de reagentes de alvos é otimizado para a detecção de DNA para ASFV: uma amostra fortemente positiva com DNA alvo pode competir na detecção do controle interno.

‡Uma amostra inválida pode ser uma indicação de falha na adição da amostra, extração e/ou da PCR. Recomenda-se que o DNA seja diluído cinco vezes em água grau PCR e novamente testado; incluir o DNA não diluído como uma amostra. Se o teste ainda não validar uma nova extração é recomendada.

**Para assistência técnica:**

IDEXX EUA Tel: +1 800 548 9997 ou +1 207 556 4895

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Contate o representante local ou distribuidor IDEXX ou visite: [idexx.com/contactlpd](http://idexx.com/contactlpd)

\*IDEXX, RealPCR e Test With Confidence são marcas comerciais ou marcas comerciais registradas da IDEXX Laboratories ou de suas afiliadas nos Estados Unidos e/ou em outros países. Todos os outros nomes de produtos e de empresas, assim como logotipos, são marcas comerciais de seus respectivos proprietários.

Compostos corantes neste produto são vendidas sob licença da Biosearch Technologies, Inc. e protegidos por patentes pelos Estados Unidos e em todo o mundo assim como concedida a aplicação. A licença abrange aplicações veterinárias. Não é para uso IVD humano.

Informações sobre patentes: [idexx.com/patents](http://idexx.com/patents)

©2022 IDEXX Laboratories, Inc. Todos os direitos reservados.



MENÚ



IMPRIMIR

Versión Española

# RealPCR\* ASFV DNA Test

Para uso veterinario exclusivo

## Nombre y uso previsto

La prueba RealPCR ASFV DNA Test se utiliza para la detección del ADN del virus de la peste porcina africana (African swine fever virus, ASFV) extraído de suero, plasma, sangre con EDTA, fluidos orales, tejido (pulmón, bazo, riñón, médula ósea, ganglios linfáticos, y amígdalas) y muestras de hisopos de porcino, incluyendo el jabalí. Las muestras pueden analizarse hasta en mezclas de 20 muestras. Las muestras que contengan una muestra positiva débil (por ejemplo, Ct > 32) pueden dar una respuesta negativa debido al efecto de dilución de la muestra.

## Información general

El virus de la peste porcina africana es el virus patógeno de la peste porcina africana hemorrágica. El ASFV es un agente sumamente contagioso, que con síntomas subclínicos puede infectar persistentemente a jabalíes africanos y potamoqueros de río, al igual que a las garrapatas del género *Ornithodoros*. Enfermedad de declaración obligatoria según a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), la peste porcina africana tiene una alta morbimortalidad en los cerdos domésticos. El control de los brotes de ASFV depende en gran medida de una detección temprana del virus. La RealPCR ASFV DNA Test proporciona un medio muy sensible y específico de detectar el ADN vírico.

El sistema IDEXX RealPCR es un formato modular en el que cada mezcla diana específica de una enfermedad se empareja con una mezcla maestra estandarizada para ADN o ARN y un único control positivo agrupado. Los reactivos se empaquetan de forma individual y se venden por separado para permitir flexibilidad en el manejo de los reactivos.


La RealPCR ASFV DNA Mix (ASFV DNA Mix) contiene cebadores y sondas para la detección del ADN de ASFV cuando se amplifica con el RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx). El control interno para la prueba se basa en la detección de una secuencia genómica del ADN en la muestra que se mantiene porcino. En este protocolo esta secuencia genómica recibe el nombre de Internal Sample Control (ISC). La detección del ADN endógeno en las muestras sirve de control para la adición, extracción y amplificación de muestras. En la ASFV DNA Mix, se incluyen cebadores y sondas para la detección del control interno de muestras. También está disponible un control positivo interno alternativo, el RealPCR Internal Positive Control (IPC  $\geq$  v1.2), y debe utilizarse cuando el ADN hospedador endógeno se encuentre en niveles bajos o si la presencia de este es poco probable después de la extracción (tales como muestras de alimento). El IPC contiene una versión sintética del ADN diana del ISC porcino, por lo que es compatible con la ASFV DNA Mix. Consultar el protocolo del RealPCR Internal Positive Control para [\(REF\) 99-56330](#) obtener más información.

## Materiales y almacenamiento

Identificación/ Información general	Color de la tapa	Cantidad	Almacenamiento		Ciclos de congelación/ descongelación
		100 pruebas	Al momento de recepción	Después de la reconstitución	
<b>RealPCR ASFV DNA Mix (ASFV DNA Mix), deshidratado</b>	Verde	1 x 1,0 ml	-25 y 8°C	-25 y -15°C	≤6
<p><b>[REF]</b> 99-56020</p> <p>Reconstituir hasta 1 ml en agua grado PCR. Almacenar la ASFV DNA Mix en un lugar oscuro. La fecha de vencimiento indicada en el vial es válida tanto para la forma en polvo como para la reconstituida. La etiqueta del tubo de ASFV DNA Mix indica qué versión del control positivo (PC) es compatible con esa mezcla diana. Por ejemplo, PC ≥ 1.4 significa que la mezcla diana puede ser utilizada con toda aquella versión superior o igual a la versión 1.4.</p>					
<b>RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx)</b>	Púrpura	1 x 1,0 ml	-25 y -15°C (A largo plazo)	N/C	≤6
<p><b>[REF]</b> 99-56250</p> <p>Master Mix concentrada que contiene polimerasa para el inicio en caliente para su uso con las mezclas diana del sistema IDEXX RealPCR. La DNA MMx es más viscosa que la mayoría de las mezclas maestras. Consultar la sección del procedimiento de la prueba para obtener recomendaciones sobre la manipulación. Se ha agregado un tinte de referencia (ROX) para normalizar las inexactitudes de volumen. Proteger de la luz la DNA MMx.</p>					
<b>RealPCR Positive Control, deshidratado (PC)</b>	Azul	1 x 500 µl	-25 y 8°C	-25 y -15°C	≤6
<p><b>[REF]</b> 99-56310</p> <p>Reconstituir hasta 500 µl en agua grado PCR. El PC contiene todas las secuencias diana de IDEXX RealPCR e ISC (incluidas las secuencias para ASFV) y está diseñado para su uso con todas las mezclas diana IDEXX RealPCR. La fecha de vencimiento indicada en el vial es válida tanto para la forma en polvo como para la reconstituida. El PC lleva un número de versión (por ejemplo v1.3). Cuando se desarrollan nuevas mezclas diana, se añaden nuevas secuencias diana al PC y se incrementa el número de versión de éste (por ejemplo, v1.3 se actualizará a v1.4).</p> <p>El Control Positivo (PC) incluye la denominada IDEXX Signature (secuencia única de oligonucleótidos). La presencia de la IDEXX Signature en el área de trabajo indica contaminación por el PC. Para los laboratorios que deseen monitorizar si existe contaminación por el PC, la IDEXX Signature puede detectarse usando la mezcla diana RealPCR PC Tracker DNA Mix y la RealPCR DNA MMx.</p>					
<b>RealPCR PCR Grade Water</b>	Transparente	2 x 1,0 ml	-25 y 8°C		N/C
<p><b>[REF]</b> 99-56350</p> <p>El agua grado PCR ha sido cualificada para su uso en transcripción inversa-PCR (RT-PCR). Se usa para la reconstitución de los reactivos RealPCR. También se usa como el control negativo de la PCR en cada prueba. No trasladar viales de agua grado PCR entre las áreas de trabajo de la PCR. Se necesitan viales de agua separados para cada área, a fin de evitar el riesgo de contaminación.</p>					

**Nota:** Ver tabla al final del protocolo para las explicaciones de los símbolos utilizados en este protocolo y en las etiquetas.

## Materiales necesarios que no se incluyen

- Kit comercial de extracción de ADN
  - Opcional: Centrífuga con un rotor y adaptadores para placas de pocillos múltiples
  - Microcentrifuga para microtubos de 2 ml capaz de alcanzar 1500 – 3000 x g
  - Equipo adecuado de protección personal (p. ej., guantes, bata de laboratorio)
  - Puntas de pipetas resistentes a los aerosoles y libres de nucleasa
  - Microtubos estériles para la preparación de la Mezcla PCR
  - Pipetas (5–1000  $\mu$ l); destinadas a la preparación de la Mezcla PCR
  - Placas para PCR de 96 o 384 pocillos y cubiertas de láminas o placas adhesivas ópticas
-  • Instrumento para PCR en tiempo real  
(Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® 7500 Fast System (Standard y Fast Mode), 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 (solo para el rotor de 72 pocillos), Roche LightCycler® 480 o equivalente).
- Nota:** el aparato LC480 de Roche requiere calibración y ajustes adicionales del software. El servicio técnico de IDEXX puede proporcionar ayuda sobre la utilización del instrumento mencionado arriba con los reactivos RealPCR.

## Prácticas y advertencias de laboratorio

- No usar los reactivos después de la fecha de vencimiento.
- Todo el procedimiento debe realizarse en condiciones libres de nucleasa.
- Utilizar guantes libres de polvo al trabajar con reactivos y ácidos nucleicos.
- Para evitar la contaminación cruzada, usar puntas de pipetas resistentes a los aerosoles y libres de nucleasa para todas las recolecciones y separar físicamente los lugares de trabajo para la extracción o el manejo de ácidos nucleicos, la preparación de la PCR y la PCR.

## Reconstitución de los componentes en polvo

Reconstituir la ASFV DNA Mix y el Control Positivo pipeteando agua grado PCR hasta el volumen que se indica en la etiqueta del componente. Dejar reposar a una temperatura de entre 18 y 26°C durante, al menos, 10 minutos; mezclar y centrifugar brevemente antes de su uso. Una vez que se hayan reconstituido la ASFV DNA Mix y el PC, dividir en las alícuotas que correspondan y almacenar las soluciones congeladas. Al manejar componentes congelados, descongelar a una temperatura de entre 18 y 26°C durante, aproximadamente, de 15 a 30 minutos, mezclar suavemente después centrifugar brevemente (~1500 – 3000  $\times$  g).

## Extracción de ADN

La ASFV DNA Mix se ha validado mediante los métodos de extracción comerciales que se nombran a continuación. También podrán usarse otros métodos de extracción o lisis una vez que hayan sido validados por el laboratorio.

RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX)  
RealPCR DNA/RNA Spin Column Kit (IDEXX)  
MagMAX Pure- 96 Viral RNA Isolation Kit (Thermo)  
QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)  
High Pure PCR Template Prep Kit (Roche)

Almacenar el ADN purificado a  $<-15^{\circ}\text{C}$  si la prueba no se realiza inmediatamente después de la extracción de ADN. Se recomienda incluir como muestra un control de extracción negativo (muestra simulada).

## Procedimiento de la Prueba

### 1 Preparación de la mezcla PCR.

- Mezclar la DNA MMx descongelada mediante inversión o vortex suave.
- La DNA MMx es una solución viscosa; pipetear siempre lentamente.
- Para preparar la mezcla PCR añadir 10  $\mu$ l de ASFV DNA Mix y 10  $\mu$ l de DNA MMx para cada reacción.
- Cuando se prepare la Mezcla PCR, pipetear primero la ASFV DNA Mix en el tubo y después añadir la DNA MMx. Mover la pipeta hacia arriba y abajo varias veces para enjuagar la punta de la pipeta con MMx.
- Invertir o mezclar con un agitador vorticial suavemente para garantizar que los componentes se hayan mezclado bien.
- Añadir la mezcla PCR lentamente a la placa PCR.

La mezcla PCR se puede conservar entre 2 y 8°C durante un periodo de hasta 24 horas o entre -25 a -15°C durante un periodo de hasta 2 semanas. Proteger de la luz. .

### 2 Añadir 20 $\mu$ l de la mezcla PCR en los pocillos requeridos de la placa multipocillo.

### 3 Añadir 5 $\mu$ l de ADN muestra en cada pocillo. El volumen de la reacción final es de 25 $\mu$ l.

### 4 Incluir el PC (5 $\mu$ l) y el control negativo de PCR (5 $\mu$ l de agua grado PCR) por cada prueba que se realice.

### 5 Cubrir la placa y hacer girar brevemente la placa, si es necesario, para que se asiente el contenido y eliminar las burbujas de aire.

### 6 Configurar el termociclador con las configuraciones estándar de IDEXX RealPCR y el programa de ciclos.

#### Parámetros para el indicador y el inhibidor

Diana	Indicador	Inhibidor
ASFV	FAM™	BHQ® (ninguno)
Control Interno (ISC/IPC)	HEX™ (VIC)	BHQ (ninguno)
Referencia pasiva	ROX™	N/C

#### Programa estándar de Ciclos RealPCR DNA/RNA

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Transcripción Inversa (RT)	50°C	15 min.	1
Desnaturalización	95°C	1 min.	1
Amplificación**	95°C	15 s	45
	60°C	30 s	

\*\*Asegurarse de que el instrumento se fije para medir la fluorescencia después del paso de amplificación de 60°C.

**Nota:** para las secuencias dianas de ADN se puede aplicar el protocolo de ciclación sin el paso "RT". No obstante, se recomienda utilizar por sistema el paso "RT" para incorporar los análisis de RNA con más facilidad al flujo de trabajo.



## 7 Analizar los datos

Cuando se configure el software del instrumento, asignar un identificador único a cada diana y control interno. Por ejemplo, cuando las dianas A y B están en una sola placa, los pocillos A deben ser analizados independientemente de los pocillos B. Consultar el manual del usuario del instrumento específico para obtener orientación sobre cómo analizar datos. Para establecer el valor umbral, usar el parámetro Auto Ct.

- En el Agilent Mx3000P y en el Mx3005P asegurarse de que se está utilizando para el análisis el método "background-based threshold".
- Para el instrumento QIAGEN Rotor-Gene, ajustar de manera manual el umbral por encima del ruido de fondo en la fase lineal de la amplificación exponencial. Es preferible realizarlo en gráficas logarítmicas siendo necesario para cada marcador de la mezcla diana.
- Instrumentos Applied Biosystems— En ciertas situaciones el parámetro de auto umbral no produce resultados satisfactorios. En estos casos, es necesario un ajuste manual del umbral para determinar los valores Ct. Como mejor se realiza es en el diagrama de distribución de datos y se debe repetir para cada indicador en la mezcla diana.

### Criterios de validez

	<u>Valor Ct de FAM</u>	<u>Valor Ct de HEX (VIC)</u>
Control Positivo	<38	<38
Control Negativo PCR	Sin señal	Sin señal

## 8 Interpretación de los resultados

<u>Resultado de las muestras</u>	<u>Señal FAM</u>	<u>Señal HEX (VIC)</u>	<u>Otras características</u>
ADN de ASFV detectado	Sí	Sí/No	Un valor Ct positivo y una curva de amplificación característica en comparación con el control negativo PCR.  Se espera una curva de amplificación del control interno en el canal de HEX (VIC); sin embargo, es posible que algunas muestras fuertemente positivas para ADN de ASFV tengan un resultado negativo para el control interno. <sup>†</sup>
ADN de ASFV no detectado	No	Sí	Curva de amplificación en el canal de HEX (VIC).
Inválido <sup>‡</sup>	No	No	La ausencia de una curva de amplificación en los canales FAM y HEX (VIC) indica un resultado inválido.

<sup>†</sup>Los reactivos de la mezcla diana se encuentran optimizados para detectar el ADN de ASFV; una muestra fuertemente positiva en ADN puede sobrepasar la detección del control interno.

<sup>‡</sup>Un resultado no válido puede indicar un problema al añadir la muestra, de extracción y/o durante el protocolo de PCR. Se recomienda diluir el ADN a 1/5 con agua de calidad PCR antes de volver a realizar la prueba e incluir una muestra de ADN no diluido como muestra. Si la prueba sigue resultando inválida se recomienda proceder a una nueva extracción.

**Para asistencia técnica:**

IDEXX EE.UU. Tel: +1 800 548 9997 o +1 207 556 4895

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Contacte al representante local o distribuidor IDEXX o visite: [idexx.com/contactlpd](http://idexx.com/contactlpd)

**N.º de registro: 10416-RD**

\*IDEXX, RealPCR y Test With Confidence son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de IDEXX Laboratories o sus afiliadas en los Estados Unidos y/u otros países. Todos los demás logotipos y nombres de productos y compañías son marcas comerciales de sus respectivos titulares.

Los compuestos colorantes de este producto se venden bajo licencia de Biosearch Technologies, Inc. y están protegidos por las patentes de Estados Unidos y mundiales bien ya concedidas o en proceso Esta licencia cubre las aplicaciones veterinarias. No para su uso en diagnóstico in vitro humano.

Información de patentes: [idexx.com/patents](http://idexx.com/patents)

©2022 IDEXX Laboratories, Inc. Todos los derechos reservados.



MENU



STAMPA

Versione italiana

# RealPCR\* ASFV DNA Test

Solo per uso veterinario

## Nome e uso previsto

Il RealPCR ASFV DNA Test è utilizzato per la rilevazione del DNA del virus della peste suina africana (African Swine Fever Virus, ASFV) estratto dal siero, dal plasma, dal sangue con EDTA, fluidi orali, dai tessuti (polmoni, milza, reni, linfonodi, midollo osseo e tonsille) e dai tamponi dei suini, inclusi i cinghiali. I campioni possono essere testati in pool fino a 20. I pool contenenti un singolo campione debole (ad esempio, Ct > 32) possono produrre un risultato negativo dovuto all'effetto di diluizione del pooling.

## Informazioni generali

Il virus della peste suina africana è l'agente responsabile della peste suina africana emorragica. L'ASFV è un agente altamente contagioso, che può infettare in maniera persistente con sintomi subclinici le zecche molli di facoceri, potamoceri e Ornithodoros. L'ASFV, malattia soggetta a obbligo di segnalazione all'Organizzazione Mondiale per la Salute Animale (World Health Organization for Animal Health, OIE), presenta elevati livelli di morbilità e mortalità tra i suini domestici. Il controllo dei focolai dell'ASFV si basa fondamentalmente sull'individuazione precoce del virus. Il RealPCR ASFV DNA Test offre uno strumento ad alta sensibilità e specificità per l'individuazione del DNA del virus.

Il sistema IDEXX RealPCR è un formato modulare in cui miscele bersaglio specifiche per patologia sono accoppiati a un mix DNA o RNA standardizzato e a un singolo controllo positivo combinato. I reagenti sono confezionati singolarmente e venduti separatamente per consentire una gestione flessibile dei reagenti.

Il RealPCR ASFV DNA Mix (ASFV DNA Mix) contiene primer e sonde per la rilevazione di DNA di ASFV quando è amplificato con RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx). Il controllo interno del test si basa sulla rilevazione di DNA endogeno suino presente nel campione e viene denominato Internal Sample Control (ISC) nel presente protocollo. La rilevazione di DNA endogeno nel campione permette di controllare l'aggiunta, l'estrazione e l'amplificazione del campione. Primer e sonde per la rilevazione dell'ISC sono compresi nel ASFV DNA Mix. Anche un controllo positivo interno opzionale, il RealPCR Internal Positive Control (IPC  $\geq$  v1.2), è disponibile e deve essere usato quando il DNA ospite endogeno è presente a livelli bassi o quando la sua presenza dopo l'estrazione è improbabile (come i campioni di mangime). L'IPC contiene una versione sintetica del target DNA corrispondente all'ISC suino ed è quindi compatibile con il ASFV DNA Mix. Per informazioni fare riferimento all'inserito tecnico del prodotto RealPCR Internal Positive Control ([REFI](#) 99-56330).

## Materiali e conservazione

Identificazione/ Informazioni generali	Colore del tappo	Quantità	Conservazione		Cicli di congelamento/ scongelo
		100 prove	Al ricevimento	Dopo la ricostituzione	
<b>RealPCR ASFV DNA Mix (ASFV DNA Mix), disidratato</b>  <b>[REF] 99-56020</b>  Ricostituire a 1 ml in di acqua per PCR. Conservare il ASFV DNA Mix al buio. La data di scadenza sul flaconcino è valida sia per la forma liofilizzata che ricostituita. L'etichetta del flaconcino ASFV DNA Mix indica la versione PC di controllo positivo (PC) che è compatibile con la miscela bersaglio. Ad esempio, PC ≥ v1.4 significa che la miscela bersaglio può essere usata con PC v1.4 e tutte le versioni 1.4 o superiori.	Verde	1 x 1,0 ml	-25 a 8°C	-25 a -15°C	≤6
<b>RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx)</b>  <b>[REF] 99-56250</b>  Master mix concentrato che include polimerasi "hot-start" per l'utilizzo con la miscela bersaglio di DNA nel sistema RealPCR di IDEXX. Il DNA MMx è più viscoso della maggior parte dei master mix– vedere la sezione Procedura di del Test per le raccomandazioni di manipolazione. È stato aggiunto un colorante di riferimento (ROX) per normalizzare le imprecisioni di volume. Proteggere il DNA MMx dalla luce.	Porpora	1 x 1,0 ml	-25 a -15°C (Lungo termine)	N/D	≤6
<b>RealPCR Positive Control, disidratato (PC)</b>  <b>[REF] 99-56310</b>  Ricostituire a 500 µl in acqua per PCR. Il PC contiene tutti i target IDEXX RealPCR e ISC (compreso il target per la ASFV) ed è destinato all'uso con tutte le miscele bersaglio IDEXX RealPCR. La data di scadenza sul flaconcino è valida sia per la forma liofilizzata che ricostituita. Il PC ha un numero di versione (ad es. v1.3). Quando sono messi a punto nuove miscele bersaglio per la linea di prodotti RealPCR, le sequenze bersaglio vengono aggiunte al PC e il numero di versione PC aumenta (ad es. v1.3 viene aggiornata a v1.4).  Nel PC è inclusa la IDEXX Signature (una sequenza oligonucleotidica). La presenza della IDEXX Signature nell'ambiente di lavoro indica la contaminazione causata dal PC. Per i laboratori che vogliono monitorare la contaminazione dal PC, la IDEXX Signature può essere rilevata usando il RealPCR PC Tracker DNA Mix e il RealPCR DNA MMx.	Blu	1 x 500 µl	-25 a 8°C	-25 a -15°C	≤6
<b>RealPCR PCR Grade Water</b>  <b>[REF] 99-56350</b>  L'acqua per PCR è qualificata per l'utilizzo della PCR retro trascrizionale (RT-PCR). Viene utilizzata per la ricostituzione dei reagenti RealPCR. È altresì utilizzata come controllo negativo PCR per ciascuna sessione di test. Non trasferire flaconcini di acqua per PCR tra le aree di lavoro PCR. Sono necessari flaconcini separati di acqua per ogni area per evitare il rischio di contaminazione.	Trasparente	2 x 1,0 ml	-25 a 8°C		N/D

**Nota:** Vedere la tabella alla fine dell'inserito per una descrizione dei simboli usati nell'inserito e nelle etichette.

## Materiali necessari ma non in dotazione

- Kit di estrazione di DNA commerciale
- Opzionale – Centrifuga con un rotore e adattatori per piastre a pozzetti multipli
- Micro-centrifuga per microprovette da 2 ml in grado di raggiungere 1500 - 3000 x g
- Adeguate dispositivi di protezione individuale (ad es. guanti, camice da laboratorio)
- Puntali per pipette privi di nucleasi resistenti alla contaminazione da aerosol
- Microprovette sterili per la preparazione del mix PCR
- Pipette (5–1000 µl); pipette dedicate per la preparazione del mix PCR
- Piastre PCR in formato da 96 o 384 pozzetti con film adesivo ottico/coperchi



- Strumento PCR in tempo reale

(Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® 7500 Fast System (Standard e Fast Mode), 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 (solo rotore da 72 pozzetti), Roche LightCycler® 480 o equivalente).

**Nota-** Lo strumento Roche LC480 richiede una calibrazione e impostazioni software aggiuntive.

L'assistenza tecnica di IDEXX può fornire indicazioni sull'utilizzo degli strumenti di cui sopra con reagenti RealPCR.

## Pratiche di laboratorio e avvertenze

- Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza.
- L'intera procedura deve essere eseguita in assenza di nucleasi.
- Indossare guanti senza polvere quando si lavora con i reagenti e acidi nucleici.
- Per evitare la contaminazione incrociata, utilizzare puntali per pipette privi di nucleasi e resistenti alla contaminazione da aerosol per qualsiasi pipettaggio, e separare fisicamente i luoghi di lavoro in cui si eseguono l'estrazione/la manipolazione degli acidi nucleici, la preparazione e realizzazione della PCR.

## Ricostituzione dei componenti liofilizzati

Ricostituire il ASFV DNA Mix e il PC pipettando acqua per PCR al volume indicato sull'etichetta dei componenti. Lasciar riposare tra 18 e 26°C per almeno 10 minuti; mescolare e microcentrifugare brevemente prima dell'uso. Una volta che il mix di rilevazione e il controllo positivo sono ricostituiti, frazionare in misura appropriata e conservare le soluzioni congelate. Dovendo manipolare componenti congelati, scongelarli tra 18 e 26°C per circa 15 a 30 minuti, mescolare delicatamente e poi microcentrifugare brevemente (~1.500 – 3.000 x g).



## Estrazione del DNA

Il ASFV DNA Mix è stato convalidato utilizzando i metodi di estrazione commerciali elencati di seguito. Possono essere utilizzati anche altri metodi di estrazione o di lisi una volta convalidati dal laboratorio.

RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX)  
RealPCR DNA/RNA Spin Column Kit (IDEXX)  
MagMAX Pure- 96 Viral RNA Isolation Kit (Thermo)  
QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)  
High Pure PCR Template Prep Kit (Roche)

Conservare il DNA purificato a <-15°C se il test non viene eseguito immediatamente dopo l'estrazione di DNA. Si raccomanda di includere come campione un controllo di estrazione negativo (mock sample).

## Procedura del test

### 1 Preparazione della miscela PCR.

- Mescolare il DNA MMx scongelato per inversione o mediante movimenti circolari delicati.
- Il DNA MMx è una soluzione viscosa; pipettarla sempre lentamente.
- Per preparare la miscela PCR aggiungere 10 µl di ASFV DNA Mix e 10 µl di DNA MMx per ogni reazione.
- Al momento della preparazione della miscela PCR, pipettare prima la miscela ASFV DNA Mix nel flaconcino e poi aggiungere il DNA MMx. Pipettare su e giù per un paio di volte per sciacquare il puntale della pipetta prima MMx.
- Miscelare delicatamente la soluzione per assicurare che i componenti siano mescolati bene.
- Pipettare la miscela PCR lentamente nella piastra PCR.

La miscela PCR può essere conservata sino a 24 ore tra 2 e 8°C oppure sino a due settimane tra -25 a -15°C. Conservare al riparo dalla luce.

### 2 Pipettare 20 µl della miscela PCR nei pozzetti richiesti della piastra a pozzetti multipli.

### 3 Aggiungere 5 µl di DNA del campione a ciascun pozzetto. Il volume di reazione finale è di 25 µl.

### 4 Includere il controllo positivo PC (5 µl) e il controllo negativo PCR (5 µl di acqua per PCR) per ciascuna sessione del test.

### 5 Coprire la piastra e ruotare brevemente la piastra, se necessario, per fare sedimentare il contenuto e rimuovere le bolle d'aria.

### 6 Impostare il termociclatore con l'IDEXX RealPCR Standard DNA/RNA Cycling Program.

#### Impostazioni per Reporter e Quencher

<u>Bersaglio</u>	<u>Reporter</u>	<u>Quencher</u>
ASFV	FAM™	BHQ® (nessuno)
Controllo Interno (ISC/IPC)	HEX™ (VIC)	BHQ (nessuno)
Riferimento passivo	ROX™	N/D

#### RealPCR\* Standard DNA/RNA Cycling Program

	<u>Temperatura</u>	<u>Tempo/Durata</u>	<u>Cicli</u>
Trascrittasi inversa (RT)	50°C	15 min.	1
Denaturazione	95°C	1 min.	1
Amplificazione**	95°C	15 sec.	45
	60°C	30 sec.	

\*\*Assicurarsi che lo strumento sia impostato per registrare la fluorescenza dopo la fase di amplificazione a 60°C.

**Nota** - Per i target di DNA, il protocollo di ciclaggio può essere eseguito senza la fase "RT". Si raccomanda, tuttavia, che la fase "RT" venga eseguita come routine per una semplice integrazione dei test RNA nel flusso di lavoro.

## 7 Analisi dei dati

Al momento di impostare il software dello strumento, assegnare un identificatore unico ad ogni target e controllo interno. Per esempio, quando il target A e il target B sono sulla stessa piastra, i pozzetti A devono essere analizzati indipendentemente dai pozzetti B. Fare riferimento al manuale specifico dello strumento per i dettagli sull'analisi dei dati. Per impostare la soglia, utilizzare l'impostazione Auto Ct.

- Sull'Agilent Mx3000P e Mx3005P assicurarsi di utilizzare per l'analisi il metodo della fluorescenza con soglia basata sul valore di fondo.
- Per lo strumento QIAGEN Rotor-Gene regolare la linea di soglia sopra il background nella fase lineare dell'amplificazione esponenziale. Questa operazione viene eseguita al meglio sul grafico logaritmico ed è necessaria per ogni riferimento del mix di destinazione.
- Strumenti Applied Biosystems— In determinate situazioni l'impostazione della soglia automatica non produce risultati soddisfacenti. In queste situazioni, è necessaria una regolazione manuale della soglia per determinare i valori di Ct. Questa operazione viene eseguita al meglio sul grafico logaritmico ed è necessaria per ogni riferimento del mix di destinazione.

### Criteria di validità

	<u>Valore Ct FAM</u>	<u>Valore Ct HEX (VIC)</u>
Controllo positivo	<38	<38
Controllo negativo PCR	Nessun segnale	Nessun segnale

## 8 Interpretazione dei risultati

<u>Risultato campione</u>	<u>Segnale FAM</u>	<u>Segnale HEX (VIC)</u>	<u>Altre caratteristiche</u>
DNA di ASFV rilevato	Si	Si/No	Un valore Ct positivo e una curva caratteristica di amplificazione rispetto al controllo negativo PCR. È prevista una curva di amplificazione del controllo interno nel canale HEX (VIC); tuttavia, alcuni campioni fortemente ASFV-positivi possono causare un risultato negativo per il controllo interno. <sup>†</sup>
DNA di ASFV non rilevato	No	Si	Curva di amplificazione nel canale controllo interno HEX (VIC).
Non valido <sup>‡</sup>	No	No	L'assenza di una curva di amplificazione nei canali FAM e HEX (VIC) indica un risultato invalido.

<sup>†</sup>I reagenti della miscela bersaglio e sono ottimizzati per la rilevazione di ASFV nel DNA. Un campione di DNA fortemente positivo può impedire la rilevazione del controllo interno.

<sup>‡</sup>Un campione non valido può essere un'indicazione di un problema durante l'aggiunta, l'estrazione e/o la PCR. Si raccomanda di diluire il DNA cinque volte in acqua per PCR e ripetere il test; includere il DNA non diluito come campione. Se il test non è ancora valido, si consiglia una nuova estrazione.

**Per assistenza tecnica:**

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 o +1 207 556 4895

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Contattare il responsabile di zona o il distributore IDEXX o consultare il sito: [idexx.com/contactlpd](http://idexx.com/contactlpd)

\*IDEXX, RealPCR e Test With Confidence sono marchi commerciali o registrati di IDEXX Laboratories, Inc. o dei suoi affiliati negli Stati Uniti e/o in altri Paesi. Tutti gli altri prodotti, nomi aziendali e loghi sono marchi commerciali dei rispettivi titolari.

I coloranti presenti nel presente prodotto sono venduti su licenza di Biosearch Technologies, Inc. e sono protetti da brevetti statunitensi e mondiali o concessi o in corso di registrazione. La licenza copre le applicazioni veterinarie. Non per uso diagnostico in vitro umano.

Informazioni sui brevetti: [idexx.com/patents](http://idexx.com/patents)

©2022 IDEXX Laboratories, Inc. Tutti i diritti riservati.





МЕНЮ



ПЕЧАТЬ

Русская версия

## RealPCR\* ASFV DNA Test

Только для применения в ветеринарии

### Наименование и предназначение

Тест RealPCR ASFV DNA Test используется для обнаружения ДНК вируса африканской чумы свиней (АЧС), экстрагируемой из сыворотки, плазмы и цельной крови с ЭДТА, жидкости ротовой полости, тканей (легкие, селезенка, почки, костный мозг, лимфатические узлы, и миндалины) и смывов от домашних свиней и диких кабанов. Для исследования можно объединять до 20 проб в один образец. Объединенные образцы, содержащие одну слабоположительную пробу (например  $Ct > 32$ ) могут дать отрицательный результат из-за эффекта разведения проб.

### Общая информация

Вирус африканской чумы свиней является возбудителем геморрагической африканской чумы свиней. Вирус АЧС — высококонтагиозный возбудитель, которому в субклинической форме могут быть чаще всего подвержены бородавочники, кустарниковые свиньи, а также аргасовые клещи из семейства паразитиформных клещей. В соответствии с положением Международного Эпизоотического Бюро (МЭБ) вирус АЧС является причиной высокой заболеваемости и смертности среди домашних свиней. Стратегия борьбы с АЧС основывается на раннем обнаружении вируса. Тест RealPCR ASFV DNA Test является высокочувствительным и специфичным тестом для обнаружения вирусной ДНК.

Тест-система IDEXX RealPCR имеет модульный формат, в котором детекционная смесь, специфичная к данному заболеванию, сочетается со стандартизированной реакционной смесью ДНК или РНК (мастер-миксом), а также единым смешанным Положительным контролем. Реагенты имеют индивидуальную упаковку и продаются отдельно, что позволяет использовать их в любой комплектации.

Детекционная смесь RealPCR ASFV DNA Mix (ASFV DNA Mix) содержит праймеры и зонды для детекции ДНК АЧС при амплификации с использованием мастер-микса RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx). Внутренний контроль теста основан на обнаружении консервативного участка ДНК свиньи. Эта геномная последовательность рассматривается в данном тесте как Внутренний Контрольный Образец (ISC). Обнаружение эндогенной ДНК в образце помогает проконтролировать правильность внесения образцов, экстракцию и амплификацию. Праймеры и зонды для внутреннего контроля образца входят в состав детекционной смеси ASFV DNA Mix. Факультативный внутренний положительный контроль, RealPCR Internal Positive Control (IPC  $\geq v1.2$ ), также доступен и используется, когда эндогенная ДНК хозяина присутствует в низких концентрациях или не обнаруживается после экстракции (как может быть в пробах пищевого производства). IPC содержит искусственно синтезированную ДНК свиньи для ISC, и, соответственно, совместим с Детекционной смесью ASFV DNA Mix. Более подробная информация представлена в инструкции к Внутреннему Положительному Контролю RealPCR IPC (REF 99-56330).

## Материалы и условия хранения

Идентификация/ Общая информация	Цвет крышки	Количество	Хранение		Циклы замораживания/ размораживания
		100 тестов	При получении	После разбавления	
<b>RealPCR ASFV DNA Mix (ASFV DNA Mix), сухой</b>	Зеленый	1 x 1,0 мл	-25 до 8°C	-25 до -15°C	≤6
<p><b>[REF]</b> 99-56020</p> <p>Восстановите до 1 мл, используя воду, для ПЦР. Храните ASFV DNA Mix в темном месте. Срок годности на флаконе действителен как для сухой, так и восстановленной смеси. На этикетке пробирки с ASFV DNA Mix указана версия Положительного Контроля (PC), совместимого с этой Детекционной смесью. Например, PC ≥ v1.4 значит, что Детекционную смесь можно использовать с PC версии 1.4 и выше.</p>					
<b>RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx)</b>	Пурпурный	1 x 1,0 мл	-25 до -15°C (длительное)	Не применимо	≤6
<p><b>[REF]</b> 99-56250</p> <p>Концентрированный Мастер-Микс, включает hot-start полимеразу для использования с ДНК-детекционными смесями в системе IDEXX RealPCR. ДНК MMx более вязкий, чем большинство мастер-миксов - рекомендации по работе с реагентом указаны в Процедуруе Анализа. Добавлена референсная краска (ROX) для нормализации объемной погрешности. Защищите ДНК MMx от света.</p>					
<b>RealPCR Positive Control, сухой (PC)</b>	Синий	1 x 500 мкл	-25 до 8°C	-25 до -15°C	≤6
<p><b>[REF]</b> 99-56310</p> <p>Восстановите до 500 мкл, используя воду для ПЦР. PC содержит все IDEXX RealPCR и ISC мишени (включая мишени для ASFV) и подходит для использования со всеми детекционными смесями IDEXX RealPCR. Срок годности, указанный на ёмкости, действителен как для сухой, так и для восстановленной формы. PC имеет номер версии (например v1.3). Когда в линейке RealPCR появляется новая детекционная смесь, в состав PC добавляются новые последовательности-мишени и PC приобретает новый, более высокий номер версии (например v1.3 становится v1.4).</p> <p>Положительный Контроль включает в себя IDEXX Signature (уникальную последовательность олигонуклеотидов). Присутствие IDEXX Signature в лабораторной среде указывает на ее загрязнение Положительным Контролем. Лаборатории, желающие отслеживать контаминацию Положительным Контролем, могут определять IDEXX Signature при использовании RealPCR PC Tracker DNA Mix и RealPCR DNA MMx.</p>					
<b>RealPCR PCR Grade Water</b>	Прозрачная	2 x 1,0 мл	-25 до 8°C		Не применимо
<p><b>[REF]</b> 99-56350</p> <p>Вода, пригодная для ПЦР, отвечает требованиям к использованию для ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR). Она используется для разведения RealPCR реагентов. Она используется для разбавления Детекционных смесей и Положительного контроля RealPCR. Она также применяется для каждого цикла ПЦР как Отрицательный контроль. Не переносите флаконы с водой из одной рабочей зоны в другую. Для избегания контаминации следует использовать разные флаконы с водой для разных зон.</p>					

**ПРИМЕЧАНИЕ:** см. таблицу на последней странице с описаниями международных символов, используемых в инструкции и на этикетках.

## Необходимые материалы, не входящие в набор

- Коммерческий набор для экстракции ДНК
  - Факультативно—Центрифуга с ротором и адаптерами для многолуночных планшет.
  - Микроцентрифуга для микропробирок по 2 мл для использования при 1500 – 3000 x g
  - Необходимые средства личной защиты (такие, как перчатки, халат и пр.).
  - Наконечники без нуклеазы, гидрофобные.
  - Стерильные микропробирки для приготовления ПЦР-смеси.
  - Дозаторы (5–1000 мкл); специально выделенные для работы с ПЦР-смесью.
  - 96- или 384-луночный ПЦР-планшет и плёнка для заклеивания планшета/крышка.
- 👁️ • Анализатор Real-time PCR  
(Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® 7500 Fast System (Standard и Fast Mode), 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 (Только 72-луночный ротор), Roche LightCycler® 480 или эквивалентные).
- Примечание:** инструмент Roche LC480 требует дополнительных калибровочных и программных настроек. Техническая поддержка IDEXX может предоставить руководство для использования этого инструмента с реагентами RealPCR.

## Меры предосторожности и правила лабораторной работы

- Не используйте реагенты с истекшим сроком годности.
- Вся работа должна проводиться в свободных от нуклеазы условиях.
- При работе с реагентами и нуклеиновыми кислотами используйте перчатки без талька.
- Чтобы избежать контаминацию, используйте одноразовые наконечники без нуклеазы и с антиаэрозольным покрытием, а так же разделите зоны для экстракции, подготовки к ПЦР и проведения ПЦР.

## Восстановление Сухих Реагентов

Для восстановления Детекционной смеси ASFV DNA Mix и Положительного Контроля внесите Воду для ПЦР до указанного на ёмкости с реагентом объёма. Оставьте при 18 до 26°C минимум на 10 минут; перед применением перемешайте и коротко центрифугируйте. После восстановления Детекционной Смеси и Положительного Контроля разделите их на соответствующие аликвоты и храните в замороженном виде. Работая с замороженными реагентами, сначала оставьте их при 18 до 26°C примерно на 15 до 30 минут, затем аккуратно перемешайте и коротко центрифугируйте (~1,500 – 3,000 x g).

## 👁️ Пробоподготовка

ASFV DNA Mix была валидированна с использованием коммерческих наборов для экстракции, указанных ниже. Другие методы экстракции или лизиса могут быть использованы после внутрिलाбораторной валидации.

RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX)  
RealPCR DNA/RNA Spin Column Kit (IDEXX)  
MagMAX Pure- 96 Viral RNA Isolation Kit (Thermo)  
QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)  
High Pure PCR Template Prep Kit (Roche)

Если анализ проводится не сразу же после экстракции, очищенную ДНК следует хранить при температуре <-15°C. Отрицательный контроль экстракции рекомендуется исследовать как образец (ложный образец).

## Процедура анализа

- 1 Приготовление ПЦР-микса.
  - Перемешайте оттаявший мастер микс DNA MMx переворачиванием или осторожно на вортексе.
  - Раствор DNA MMx весьма вязкий; всегда пипетируйте его медленно.
  - Для подготовки ПЦР-микса добавьте 10 мкл детекционного раствора ASFV DNA Mix и 10 мкл мастер микса DNA MMx для каждой реакции.
  - При приготовлении ПЦР-микса сначала вносите в пробирку детекционный раствор ASFV DNA Mix, а затем добавляйте мастер микс DNA MMx. Несколько раз пипетируйте вверх и вниз, чтобы смыть мастер микс MMx с наконечника.
  - Аккуратно перемешайте на вортексе. Убедитесь, что компоненты тщательно перемешаны.
  - Медленно внесите ПЦР-микс на планшет для ПЦР.

ПЦР Mix можно хранить при температуре от 2 до 8°C в течение 24 часов или до 2 недель при -25 до -15°C. Оберегайте от света.

- 2 Внесите по 20 мкл ПЦР-микса в нужное количество лунок на планшете.
- 3 Добавьте по 5 мкл образца ДНК в лунки. Конечный объем реакционной смеси составляет 25 мкл.
- 4 В каждый анализ включайте положительный контроль (5 мкл) и отрицательный контроль (5 мкл Воды для ПЦР).
- 5 Накройте/заклейте планшет и, при необходимости, коротко центрифугируйте, чтобы осадить содержимое и избавиться от пузырьков.
- 6 Запрограммируйте амплификатор в соответствии со Стандартной ДНК/РНК Программой IDEXX RealPCR.

### Настройки для Reporter и Quencher

Цель исследования	Reporter	Quencher
ASFV	FAM™	BHQ® (нет)
Внутренний Контроль (ISC/IPC)	HEX™ (VIC)	BHQ (нет)
Пассивный Референтный канал	ROX™	Не применимо

### Стандартная ДНК/РНК Программа RealPCR\*

	Температура	Время	Циклы
Обратная транскрипция (RT)	50°C	15 мин.	1
Денатурация	95°C	1 мин.	1
Амплификация**	95°C	15 сек.	45
	60°C	30 сек.	

\*\*Убедитесь, что термоциклер настроен на считывание флюоресценции при 60°C во время амплификации.

**Примечание:** для ДНК мишеней, исследование может проводиться без этапа "RT". Однако этот "RT" этап рекомендуется для рутинного использования, что позволяет легко внедрить РНК тесты в рабочий процесс.

## 7 Проведите анализ данных

При настройке программного обеспечения аппарата, присвойте уникальный идентификатор для каждой цели и внутреннего контроля. Например, когда тесты А и В проводятся на одном планшете, то лунки тест А должны быть проанализированы независимо от лунок теста В. Обратитесь к руководству по эксплуатации конкретного инструмента для получения сведений о том, как анализировать данные. Обратитесь к руководству по использованию соответствующего прибора для получения рекомендаций по анализу данных. Для установления порогового значения используйте настройку Auto Ct.

- При работе с системами компании Agilent Mx3000P и Mx3005P удостоверьтесь, что для анализа используется метод фоновой пороговой флуоресценции.
- Для инструмента QIAGEN Rotor-Gene вручную установите пороговое значение выше фона в линейной фазе экспоненциальной амплификации. Это лучше всего делать на графиках во время их просмотра и необходимо производить для канала, используемого для детекционного раствора.
- Инструменты Applied Biosystems— В некоторых ситуациях автоматически установленное пороговое значение не позволяет получать удовлетворительные результаты. В таких ситуациях для определения величины Ct пороговое значение необходимо установить вручную. Это лучше всего сделать при просмотре графиков и необходимо повторить для каждого репортера в детекционном растворе.

### Критерии достоверности

	FAM Ct value	HEX (VIC) Ct value
Положительный Контроль	<38	<38
Отрицательный Контроль	Нет сигнала	Нет сигнала

## 8 Интерпретация результатов

Результат анализа образца	Сигнал FAM	Сигнал HEX (VIC)	Другие характеристики
АЧС—Положительный	Да	Да/Нет	Положительное значение Ct и характерная кривая амплификации по сравнению с Отрицательным конт. ПЦР. Кривая амплификации для Внутреннего контрольного образца ожидается в канале HEX (VIC); однако для некоторых резко положительных по ASFV проб может отмечаться отрицательный результат для Внутреннего контроля. <sup>†</sup>
АЧС—Отрицательный	Нет	Да	Кривая амплификации по каналу Внутреннего контроля HEX (VIC).
Недействительный <sup>‡</sup>	Нет	Нет	Отсутствие кривой амплификации в каналах FAM, и HEX (VIC) указывает на недействительный результат.

<sup>†</sup>Детекционный раствор оптимизирован для обнаружения ДНК возбудителя АЧС; выражено положительная проба может конкурировать с внутренним контрольным образцом (ISC) и привести в его отношении к отрицательному результату.

<sup>‡</sup>Недействительный результат анализа образца может указывать на неправильное добавление, экстракцию образца и/или ошибки в проведении ПЦР. Рекомендуется пятикратное разведение ДНК в воде, пригодной для ПЦР, и проведение повторного тестирования; также включите образец неразведенной ДНК. Если тест по-прежнему недействителен, рекомендуется проведение новой экстракции.

**Для получения технической помощи:**

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 or +1 207 556 4895

IDEXX Europe Tel: +800 727 43399

Обратитесь к Региональному менеджеру IDEXX или дистрибьютору, или посетите наш веб-сайт [idexx.com/contactlpd](http://idexx.com/contactlpd)

\*IDEXX, RealPCR and Test With Confidence являются торговыми марками или зарегистрированными торговыми марками IDEXX Laboratories, Inc. или ее филиалов в США и/или других странах. Все остальные названия продуктов и компаний, а также логотипы являются торговыми марками их соответствующих владельцев.

Состав красителя в этом продукте продается Biosearch Technologies, Inc. и защищен американскими и мировыми либо заявленными в приложении патентами. Лицензия распространяется на применение в ветеринарии. Не для использования в лабораторной диагностике человека.

Информация о патенте: [idexx.com/patents](http://idexx.com/patents)

©2022 IDEXX Laboratories, Inc. Все права защищены.



MENU



PRINT

Wersja polska

## RealPCR\* ASFV DNA Test

Wyłącznie do użytku weterynaryjnego

### Nazwa i przeznaczenie

Test RealPCR ASFV DNA Test służy do wykrywania DNA wirusa afrykańskiego pomoru świń (ASFV) wyizolowanego z surowicy, osocza, pełnej krwi pobranej na EDTA, płynu z jamy gębowej (oral fluid), tkanek (płuc, śledziony, nerek, szpiku kostnego, węzłów chłonnych i migdałków) oraz wymazów pochodzących od świń, w tym dzików. Próbkę można badać w pulach do 20 sztuk. Pule zawierające pojedynczą próbkę słabo dodatnią (np.: o Ct > 32) mogą uzyskać wynik ujemny wskutek efektu rozcieńczenia próbki w puli.

**Uwaga:** W Polsce stosowanie wymazów jest ograniczone do wymazów krwi.

### Informacje ogólne

Wirus afrykańskiego pomoru świń jest czynnikiem chorobotwórczym krwotocznego afrykańskiego pomoru świń. ASFV to wysoce zakaźny czynnik, który nawet przy objawach subklinicznych może wciąż zakażać guźce, dzikany zaroślowe, jak również kleszcze miękkie z gatunku *Onrithodoros*. Jako chorobę podlegającą obowiązkowi zgłoszenia do Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE), zakażenie wirusem ASFV charakteryzuje wysoki stopień zachorowalności i śmiertelności u świń domowych. Kontrolowanie wybuchów epidemii zakażeń wirusem ASFV zależy w dużej mierze od wczesnego wykrycia wirusa. RealPCR ASFV DNA Test to wysoce czuły i specyficzny test przeznaczony do wykrywania DNA wirusa ASF.

System testowy IDEXX RealPCR ma charakter modułowy, w którym specyficzne dla danej jednostki chorobowej mieszaniny służące do wykrycia wirusa (target mix) łączy się ze standaryzowanymi mieszaninami DNA lub RNA (master mix) oraz pojedynczą kontrolą dodatnią testu. Poszczególne odczynniki są pakowane indywidualnie oraz sprzedawane oddzielnie, aby umożliwić wygodne i ekonomiczne posługiwanie się nimi w laboratorium.

Mieszanina detekcyjna RealPCR ASFV DNA Mix (ASFV DNA Mix) zawiera startery i sondy służące do wykrywania DNA ASFV powielanego z wykorzystaniem mieszaniny RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx). Wewnętrzna kontrola testu oparta jest na wykrywaniu w próbce badanej genomowej sekwencji DNA konserwatywnej dla świń. Na potrzeby tego protokołu ta genomowa sekwencja nazwana została wewnętrzną kontrolą próbki (ISC). Wykrycie endogennego DNA w badanej próbce weryfikuje etap dodania próbki do mieszaniny reakcyjnej, etap ekstrakcji oraz samej amplifikacji. Startery oraz sonda wykrywające wewnętrzną kontrolę próbki zawarte są w zestawie w mieszaninie ASFV DNA Mix. Dostępna jest także opcjonalna wewnętrzna kontrola dodatnia RealPCR Internal Positive Control (IPC  $\geq$  v1.2). Należy używać jej, jeśli stężenia endogennego DNA gospodarza są niskie lub jeśli jego występowanie po ekstrakcji jest mało prawdopodobne (jak np.: w próbce paszy). IPC zawiera syntetyczną wersję ISC - świńskiej genomowej sekwencji DNA i dzięki temu jest zgodna z mieszaniną detekcyjną ASFV DNA Mix. Szczegółowe informacje znajdziesz w instrukcji wewnętrznej kontroli dodatniej RealPCR Internal Positive Control ([REF](#) 99-56330).

## Odczynniki i warunki ich przechowywania

Odczynnik/ informacje ogólne	Kolor nakrętki	Ilość	Przechowywanie		Liczba cykli zamrażania/ rozmrężania
		100 testów	Po otrzymaniu zestawu	Odczynnik po rekonstytucji	
<b>RealPCR ASFV DNA Mix (ASFV DNA Mix), Liofilizowana</b>	Zielony	1 x 1,0 ml	-25 do 8°C	-25 do -15°C	≤6
<p><b>[REF]</b> 99-56020</p> <p>Rozpuść w 1 ml wody do testów- PCR Grade Water. Mieszaninę ASFV DNA Mix należy przechowywać bez dostępu światła. Data ważności na folcie dotyczy zarówno liofilizatu jak i formy rozpuszczonej. Na etykiecie folki z mieszaniną detekcyjną ASFV DNA Mix podano wersję kontroli dodatniej PC z którą odczynnik może być używany. Np. PC ≥ v1.4 oznacza, że mieszaniny detekcyjnej ASFV DNA Mix można używać z kontrolą dodatnią w wersji PC 1.4 lub wyższej.</p>					
<b>RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx)</b>	Fioletowy	1 x 1,0 ml	-25 do -15°C (długoterminowo)	Nie dotyczy	≤6
<p><b>[REF]</b> 99-56250</p> <p>Stężona mieszanina Master Mix DNA zawierająca polimerazę typu hot-start do stosowania razem z mieszaninami detekcyjnymi DNA w systemie IDEXX RealPCR. Mieszanina Master Mix DNA jest bardziej lepka niż większość mieszanin tego typu – proszę zapoznać się z opisem wykonania testu, aby stosować ten odczynnik właściwie. Barwnik referencyjny (ROX) dodany do odczynnika służy normalizacji objętości pobieranych pipetą. Mieszaninę DNA MMx należy chronić przed światłem.</p>					
<b>RealPCR Positive Control, Liofilizowana (PC)</b>	Niebieski	1 x 500 µl	-25 do 8°C	-25 do -15°C	≤6
<p><b>[REF]</b> 99-56310</p> <p>Rozpuść w 500 µl wody do testów- PCR Grade Water. Odczynnik PC zawiera kontrole dodatnie dla wszystkich kierunków badawczych testów IDEXX RealPCR oraz ich wewnętrznych kontroli ISC (w tym również dla testu w kierunku ASFV) i jest przeznaczony do stosowania ze wszystkimi mieszaninami detekcyjnymi IDEXX RealPCR. Data ważności na folcie dotyczy zarówno liofilizatu jak i formy rozpuszczonej. Odczynnik PC ma numer wersji (np. v1.3). Wprowadzając nowy test w systemie RealPCR, producent wprowadza do Kontroli Dodatniej sekwencje dla danego kierunku badawczego, a numer wersji Kontroli Dodatniej wzrasta (na przykład dotychczasowy numer wersji v1.3 zostaje zmieniony na 1.4).</p> <p>Kontrola dodatnia PC zawiera sekwencję znacznikową IDEXX Signature (unikalną sekwencję oligonukleotydów). Wykrycie w badanej próbce pobranej z przestrzeni laboratorium obecności sekwencji znacznikowej IDEXX Signature wskazuje na kontaminację środowiska kontrolą dodatnią PC. Laboratoria, które chcą monitorować kontaminację przestrzeni laboratorium kontrolą dodatnią PC mogą wykryć obecność sekwencji znacznikowej IDEXX Signature używając mieszaniny wykrywającej RealPCR PC Tracker DNA Mix oraz mieszaniny master mix RealPCR DNA MMx.</p>					
<b>RealPCR PCR Grade Water</b>	Bezbarwny	2 x 1,0 ml	-25 do 8°C		Nie dotyczy
<p><b>[REF]</b> 99-56350</p> <p>Woda do testów PCR przeznaczona jest do stosowania w testach odwrotnej transkrypcji-PCR (RT-PCR). Służy do rozpuszczania odczynników stosowanych w reakcjach RealPCR. Stosowana jest także jako kontrola ujemna PCR w każdym badaniu. Nie należy przenosić tego odczynnika między strefami roboczymi laboratorium PCR (strefa przygotowywania mieszaniny reakcyjnej, izolacji, wykonywania testu PCR etc.). Aby uniknąć ryzyka kontaminacji, w każdej strefie powinna znajdować się oddzielna, dedykowana folka wody do testów PCR.</p>					

**Uwaga:** W końcowej części niniejszej instrukcji znajduje się tabela, w której opisano symbole użyte w instrukcji wykonania oraz na etykietach odczynników.



## Materiały niezbędne do wykonania badania, ale niedostępne w zestawie diagnostycznym

- Komercyjny zestaw do ekstrakcji DNA
- Opcjonalnie: wirówka z rotorem i adapterami na mikro płytki
- Mikrowirówka na próbki o pojemności 2 ml osiągnąca przeciążenia 1500 – 3000xg
- Odpowiednie ubranie ochronne (np.: rękawiczki bezpudrowe, fartuch)
- Końcówki do pipet z filtrami, wolne od nukleaz
- Jałowe mikroprobówki do przygotowywania mieszanin reakcyjnych do testu PCR
- Pipety o pojemnościach w zakresie 5 – 1000 µl; pipety przeznaczone wyłącznie do przygotowywania mieszaniny reakcyjnej PCR
- 96- lub 384-dołkowe płytki do PCR oraz folia do zaklejania lub pokrywki do płytek
- Termocyklery do testu real-time PCR  
(Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® 7500 Fast System (Standard i Fast Mode), 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 (wyłącznie wirnik 72-dołkowy), Roche LightCycler® 480 lub sprzęt równoważny).  
**Uwaga:** aparat Roche LC480 wymaga dodatkowej kalibracji i ustawień oprogramowania.  
Dział pomocy technicznej firmy IDEXX może udzielić instrukcji dotyczących stosowania instrumentów wymienionych powyżej z odczynnikami RealPCR.

## Zasady postępowania w laboratorium i ostrzeżenia

- Nie używaj odczynników po upływie daty ich ważności
- Wszystkie etapy badania należy wykonać w środowisku wolnym od nukleaz
- Podczas pracy z odczynnikami i kwasami nukleinowymi należy używać rękawic gumowych, bezpudrowych
- Aby zapobiec kontaminacji krzyżowej należy na każdym etapie pipetowania odczynników stosować końcówki do pipet z filtrami, wolne od nukleaz oraz wydzielić fizycznie miejsca pracy (oddzielne pomieszczenia) do ekstrakcji kwasów nukleinowych, przygotowywania mieszanin reakcyjnych do PCR oraz wykonywania samego testu PCR.

## Rozpuszczanie odczynników dostarczanych w postaci liofilizatów

Rozpuść liofilizat mieszaniny detekcyjnej ASFV DNA Mix oraz liofilizowaną kontrolę dodatnią (PC), dodając do fiolek ilość wody do testów PCR określoną na etykiecie odczynnika. Pozostaw w temperaturze 18 do 26°C przynajmniej na 10 minut; dokładnie wymieszaj i lekko zwiuruj przed użyciem. Po rozpuszczeniu mieszaniny detekcyjnej ASFV DNA Mix oraz kontroli dodatniej PC rozlej odczynniki w małych objętościach do oddzielnych próbek i zamroź. Przed użyciem, zamrożone odczynniki należy rozmrozić w temperaturze 18° do 26°C przez okres od 15 do 30 minut, łagodnie wymieszać oraz lekko zwirować (~1,500 – 3,000 x g).

## Ekstrakcja DNA

Mieszaninę detekcyjną ASFV DNA Mix zwalidowano z wykorzystaniem komercyjnych zestawów do ekstrakcji podanych poniżej. Można stosować również inne metody ekstrakcji, ale po uprzedniej ich walidacji w warunkach laboratoryjnych.

RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX)  
RealPCR DNA/RNA Spin Column Kit (IDEXX)  
MagMAX Pure- 96 Viral RNA Isolation Kit (Thermo)  
QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)  
High Pure PCR Template Prep Kit (Roche)

Jeżeli analiza wyizolowanego DNA planowana jest w terminie późniejszym, zaleca się przechowywać próbki DNA w temp. poniżej –15°C. Zaleca się w trakcie badania dołączenie dodatkowej próbki (ślepej) stanowiącej kontrolę ujemną ekstrakcji.

## Sposób wykonania oznaczenia

- 1 Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej PCR.
  - Wymieszaj rozmrożoną mieszaninę Master Mix DNA odwracając fiolkę lub łagodnie mieszając na mieszadle.
  - Mieszanina Master Mix DNA jest lepka. Zawsze należy pipetować ją powoli.
  - Dla każdej badanej próbki należy zmieszać 10  $\mu$ l mieszaniny detekcyjnej ASFV DNA Mix i 10  $\mu$ l mieszaniny Master Mix DNA.
  - Przygotowując mieszaninę reakcyjną PCR, należy najpierw dodać do próbki mieszaninę detekcyjną ASFV DNA Mix, a następnie mieszaninę Master Mix DNA. Przepłucz końcówkę pipety poprzez kilkakrotne pobranie i wypuszczenie Master Mix DNA.
  - Delikatnie wymieszaj na mieszadle, aby zapewnić dokładne wymieszanie składników.
  - Łagodnie przenieś pipetą mieszaninę reakcyjną PCR na płytkę PCR.

Mieszaninę reakcyjną PCR można przechowywać w temperaturze od 2 do 8°C maksymalnie do 24 godzin lub w temperaturze od -25°C do -15°C maksymalnie do 2 tygodni. Chroń przed światłem.

- 2 Nanieś po 20  $\mu$ l mieszaniny reakcyjnej PCR do odpowiedniej liczby dołków płytki.
- 3 Dodaj po 5  $\mu$ l badanego DNA do dołków z naniesioną wcześniej mieszaniną reakcyjną PCR. Końcowa objętość reakcji wynosi 25  $\mu$ l.
- 4 Do każdego badania włącz Kontrolę Dodatnią (5  $\mu$ l) oraz kontrolę ujemną PCR (5  $\mu$ l wody do testów – RealPCR Grade Water).
- 5 Zakryj przykrywką lub zaklej płytkę i jeżeli istnieje taka potrzeba lekko odwiruj, celem usunięcia pęcherzyków powietrza oraz osadzenia całej zawartości na dnie dołka.
- 6 Wybierz w termocyklerze profil temperaturowy "IDEXX RealPCR Standard DNA/RNA".

### Ustawienia dla reportera i wygaszacza

Cel	Reporter	Wygaszczaz
ASFV	FAM™	BHQ® (brak)
Wewnętrzna Kontrola Próbkki (ISC/IPC)	HEX™ (VIC)	BHQ (brak)
Referencja bierna	ROX™	Nie dotyczy

### Profil temperaturowy IDEXX RealPCR® Standard DNA/RNA

	Temperatura	Czas	Cykle
Odwrotna transkrypcja (RT)	50°C	15 min	1
Denaturacja	95°C	1 min	1
Amplifikacja**	95°C	15 s	45
	60°C	30 s	

\*\*Odczyt fluorescencji powinien odbywać się po etapie amplifikacji w temp. 60°C.

**Uwaga:** w przypadku badania wykrywającego DNA w profilu temperaturowym nie jest konieczny etap odwrotnej transkrypcji „RT” RNA. Jednakże zaleca się rutynowe stosowanie etapu „RT” tak, aby do przebiegu badania w termocyklerze można było łatwo dołączyć testy RNA.

## 7 Analiza wyników badania

Po skonfigurowaniu oprogramowania instrumentu każdemu kierunkowi badania i kontroli wewnętrznej należy przypisać niepowtarzalny identyfikator. Na przykład, jeśli na tej samej płytce wykonywane jest badanie w kierunku A i B, dolki A należy analizować niezależnie od dolków B. Uzyskane wyniki odczytów w oparciu o instrukcję obsługi posiadanego urządzenia. Aby ustawić wartość progową testu należy wybrać opcję automatyczną: „Auto Ct setting”.

- W termocyklerach Agilent Mx3000P oraz Mx3005P do analizy należy wybrać metodę oznaczania progu fluorescencji opartą o sygnał tła (background-based threshold fluorescence method).
- QIAGEN Rotor-Gene należy ręcznie wyregulować linię odcięcia nad linią tła w liniowej fazie amplifikacji wykładniczej. Najlepiej jest to zrobić na widoku wykresu logarytmicznego i należy to zrobić dla każdego produktu reporterowego w badanej mieszaninie docelowej.
- Termocyklery firmy Applied Biosystems - w pewnych sytuacjach opcja automatycznego ustawiania linii odcięcia nie pozwala osiągnąć prawidłowych wyników. W takich przypadkach konieczne jest ręczne ustawienie linii odcięcia w celu uzyskania wartości Ct. Najlepiej jest to zrobić na widoku wykresu logarytmicznego i należy to zrobić dla każdego produktu reporterowego w badanej mieszaninie docelowej.

### Kryteria walidacji testu

	Wartość Ct dla FAM	Wartość Ct dla HEX (VIC)
Kontrola Dodatnia	<38	<38
Kontrola Ujemna PCR	Brak sygnału	Brak sygnału

## 8 Interpretacja uzyskanych wyników

Wynik badania	Sygnal FAM	Sygnal HEX (VIC)	Inne cechy
Wykryto DNA ASFV	Tak	Tak/Nie	Dodatnia wartość Ct oraz charakterystyczny kształt krzywej amplifikacji w porównaniu do kontroli ujemnej PCR. Spodziewana jest obecność krzywej amplifikacji kontroli wewnętrznej w kanale HEX (VIC); w przypadku próbek silnie ASFV- dodatnich można jednak uzyskać ujemny wynik wewnętrznej kontroli próbki (ISC). <sup>†</sup>
Nie wykryto DNA ASFV	Nie	Tak	Krzywa amplifikacji dla kanału kontroli wewnętrznej HEX (VIC).
Nieważny <sup>‡</sup>	Nie	Nie	Brak krzywej amplifikacji dla kanałów FAM i HEX (VIC) oznacza wynik nieważny.

<sup>†</sup>Mieszanina detekcyjna jest zoptymalizowana pod kątem wykrywania DNA ASFV; próbka silnie dodatnia pod względem DNA może zakłócić detekcję kontroli wewnętrznej.

<sup>‡</sup>Nieważny wynik badania próbki może wskazywać na błąd techniczny nanoszenia próbki, ekstrakcji i/lub reakcji PCR. Zaleca się wykonanie pięciokrotnego rozcieńczenia badanego DNA w wodzie do testów PCR i powtórzenie badania razem z próbką nierozcieńczonego DNA. Jeżeli wynik badania nadal jest nieważny zaleca się ponowne przeprowadzenie ekstrakcji.

**Pomoc techniczna:**

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 lub +1 207 556 4895

IDEXX Europe Tel: +800 727 43399

Skontaktuj się z regionalnym przedstawicielem IDEXX, dystrybutorem firmy IDEXX bądź odwiedź stronę internetową: [idexx.com/contactlpd](http://idexx.com/contactlpd)

\*IDEXX, RealPCR i Test With Confidence są znakami towarowymi lub zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy IDEXX Laboratories lub spółek zależnych w USA i/lub innych krajach. Wszystkie inne produkty i nazwy firm oraz logo są znakami towarowymi ich właścicieli.

Barwniki wykorzystane w niniejszym produkcie są sprzedawane na licencji firmy Biosearch Technologies, Inc. i są chronione patentami w USA i na świecie (już wydanymi lub zgłoszonymi). Licencja dotyczy zastosowań weterynaryjnych. Produkt nie jest przeznaczony do diagnostyki in vitro u ludzi.

Informacje o patentach: [idexx.com/patents](http://idexx.com/patents)

©2022 IDEXX Laboratories, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.



Menü



Drucken

Deutsche Version

## RealPCR\* ASFV DNA Test

Nur zum tierärztlichen Gebrauch

### Bezeichnung und Verwendungszweck

Der RealPCR ASFV DNA Test wird zum Nachweis von DNA des Afrikanischen Schweinepest Virus (ASPV) verwendet. Dabei wird die ASPV-DNA aus Serum, Plasma, EDTA-Blut, Speichelflüssigkeit, Gewebe (Lunge, Milz, Niere, Knochenmark, Lymphknoten und Tonsillen) und Tupferproben von Schweinen einschliesslich Wildschweinen extrahiert. Die Proben können in Pools von 20 getestet werden. Eine einzelne schwache Probe pro Pool (z. B. Ct > 32) kann aufgrund des Verdünnungseffekts in der Sammelprobe zu einem negativen Ergebnis führen.

### Allgemeine Hinweise

Das Afrikanische Schweinepest Virus ist der Erreger der hämorrhagischen Afrikanischen Schweinepest (ASP). Das ASP-Virus weist eine hohe Kontagiosität auf, wobei eine persistente Infektion von Warzenschweinen und Buschschweinen mit subklinischen Symptomen erfolgen kann. Darüber hinaus fungieren Lederzecken der Gattung Ornithodoros als Überträger des Virus. Die Afrikanische Schweinepest ist eine bei der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) anzeigepflichtige Tierseuche. Das ASP-Virus ist bei Hausschweinen durch eine hohe Morbidität und Mortalität gekennzeichnet. Die Bekämpfung von ASPV-Ausbrüchen beruht in erheblichem Maße auf einer frühen Erkennung des Virus. Der RealPCR ASFV DNA Test ist eine hochempfindliche und spezifische Methode zum Nachweis viraler DNA.

Das IDEXX RealPCR Testsystem ist modular aufgebaut und kombiniert einen krankheitsspezifischen Target-Mix mit einem standardisierten DNA- oder RNA-Master-Mix. Die Reagenzien sind einzeln verpackt und werden separat verkauft, um eine flexible Handhabung zu ermöglichen.

Der RealPCR ASFV DNA Mix (ASFV DNA Mix) enthält Primer und Sonden für den Nachweis von ASFV-DNA, welche mithilfe von RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx) amplifiziert wurde. Die interne Kontrolle für den Test basiert auf dem Nachweis von endogener Schweine DNA in der Probe und wird in diesem Protokoll als interne Probenkontrolle (Internal Sample Control, ISC) bezeichnet. Mittels Detektion endogener DNA in der Testprobe werden Zugabe, Extraktion und Amplifikation der Probe kontrolliert. Die Primer und die Sonde für den Nachweis der internen Probenkontrolle sind im ASFV DNA Mix enthalten. Die ebenfalls erhältliche optionale RealPCR Internal Positive Control (IPC, Version  $\geq$  v1.2) sollte verwendet werden, wenn die endogene Host-DNA nur in geringer Menge vorhanden ist oder nach Extraktion möglicherweise nicht vorhanden sein wird (wie zum Beispiel bei Futterproben). Die IPC enthält eine synthetische Version der Schweine ISC-DNA-Zielsequenzen und ist deshalb mit dem ASFV DNA Mix kompatibel. Die Produktbeilage zur RealPCR Internal Positive Control ([REF 99-56330](#)) enthält hierzu nähere Anweisungen.

## Materialien und Lagerung

Identifizierung/ Allgemeine Hinweise	Kappenfarbe	Menge	Lagerung		Gefrier-/ Auftauzyklen
		100 tests	Nach Erhalt	Nach der Rekonstitution	
<b>RealPCR ASFV DNA Mix (ASFV DNA Mix), (lyophilisiert)</b>	Grün	1 x 1,0 ml	-25 bis 8°C	-25 bis -15°C	≤6
<p><b>[REF]</b> 99-56020</p> <p>Mit PCR-Wasser auf 1 ml auffüllen. Den ASFV DNA Mix an einem dunklen Ort aufbewahren. Das auf dem Fläschchen angegebene Verfalldatum gilt sowohl für die lyophilisierte als auch für die rekonstituierte Form. Das ASFV DNA Mix Etikett zeigt die PC Version an, welche mit dem Target-Mix kompatibel ist. Zum Beispiel bedeutet PC ≥ 1.4, dass der Target-Mix mit der PC Version 1.4 und allen Versionen größer als 1.4 verwendet werden kann.</p>					
<b>RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx)</b>	Lila	1 x 1,0 ml	-25 bis -15°C (Langzeitlagerung)	entfällt	≤6
<p><b>[REF]</b> 99-56250</p> <p>Der konzentrierte Master Mix enthält eine ‚Hot-start‘ Polymerase zur Verwendung mit DNA-Target-Mix im IDEXX RealPCR System. Der DNA MMx weist eine höhere Viskosität als die meisten Master Mix-Produkte auf. Im Abschnitt Testverfahren sind Empfehlungen für die Handhabung aufgeführt. Für die Normalisierung von Volumenungenauigkeiten wurde ein Referenzfarbstoff (ROX) hinzugefügt. Der DNA MMx muss vor Licht geschützt werden.</p>					
<b>RealPCR Positive Control, (PC) (lyophilisiert)</b>	Blau	1 x 500 µl	-25 bis 8°C	-25 bis -15°C	≤6
<p><b>[REF]</b> 99-56310</p> <p>Mit PCR-Wasser auf 500 µl auffüllen. Die PC enthält alle IDEXX RealPCR und ISC-Zielsequenzen (einschließlich der Zielsequenzen für ASFV) und kann mit jedem IDEXX RealPCR Target-Mix verwendet werden. Das auf dem Fläschchen angegebene Verfalldatum gilt sowohl für die lyophilisierte als auch für die rekonstituierte Form. Die RealPCR PC hat eine Versionsnummer (z.B. V 1.3). Sobald ein neuer Target-Mix für die RealPCR Produktlinie entwickelt wird und Zielsequenzen zur PC hinzugefügt werden, ändert sich die PC Version (z.B. V 1.3 wird zu V 1.4).</p> <p>Die PC umfasst die IDEXX Signature (eine einzigartige Oligonukleotidsequenz). Die Anwesenheit von IDEXX Signature im Arbeitsbereich lässt auf eine PC Kontamination schließen. Für Laboratorien, die die PC Kontamination im Arbeitsbereich überwachen möchten, kann die IDEXX Signature mittels RealPCR PC Tracker DNA Mix und RealPCR DNA MMx detektiert werden.</p>					
<b>RealPCR PCR Grade Water</b>	Farblos	2 x 1,0 ml	-25 bis 8°C	entfällt	
<p><b>[REF]</b> 99-56350</p> <p>Das ultrareine Wasser (RealPCR PCR Grade Water) wurde zum Gebrauch für die reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR) validiert. Es wird für die Rekonstitution eines RealPCR-Target-Mix und für die Positivkontrolle verwendet. Es wird auch als PCR Negativkontrolle bei jeder Testdurchführung verwendet. Die PCR-Wasserröhrchen dürfen nicht von einem zum anderen PCR-Arbeitsbereich übertragen werden. In jedem Arbeitsbereich separate Wasserröhrchen verwenden, um ein Kontaminationsrisiko zu vermeiden.</p>					

**Hinweis:** Am Ende dieser Gebrauchsinformation befindet sich eine Tabelle, welche die im Text und auf den Etiketten verwendeten Symbole erläutert.

## Nicht enthaltene, erforderliche Materialien

- Im Handel erhältliches DNA-Extraktionskit
- Optional—Zentrifuge mit Rotor und Adapter für Multiwell-Platten
- Mikrozentrifuge für 2 ml Mikroröhrchen (1500 bis 3000 x g)
- Geeignete persönliche Schutzausrüstung (z. B. Schutzhandschuhe, Laborkittel)
- Nukleasefreie, aerosolbeständige Pipettenspitzen
- Sterile Mikroröhrchen für die Zubereitung der PCR-Gemischs
- Pipetten (5–1000 µl), welche ausschließlich für die Herstellung des PCR-Gemischs bestimmt sind
- 96- oder 384-Well-PCR-Platten mit optisch klaren, selbsthaftenden Folien/Plattenabdeckungen

-  Echtzeit-PCR-Gerät  
(Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® 7500 Fast System (Standard und Fast Mode), 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 (nur 72-Well-Rotor), Roche LightCycler® 480 oder gleichwertig).

**Hinweis:** Beim Roche LC 480 sind zusätzliche Kalibrierungs- und Software-Einstellungen nötig. Der IDEXX Technische Support Service kann Hilfestellung für die Benutzung der weiter oben erwähnten Geräte mit den RealPCR Reagenzien geben.

## Laborpraktiken und Warnhinweise

- Die Reagenzien nicht nach ihrem Verfalldatum verwenden.
- Das gesamte Verfahren muss unter nukleasefreien Bedingungen durchgeführt werden.
- Bei der Arbeit mit den Reagenzien und Nukleinsäuren puderfreie Handschuhe tragen.
- Zur Vermeidung einer Kreuzkontamination stets nukleasefreie, aerosolbeständige Pipettenspitzen verwenden und die Arbeitsbereiche für die Extraktion/Handhabung der Nukleinsäure sowie das Einrichten und Durchführen der PCR voneinander abgrenzen.

## Rekonstitution der trockenen Bestandteile

Der ASFV DNA Mix und die PC müssen mit Wasser rekonstituiert und auf das Volumen, das auf dem Etikett angegeben ist, aufgefüllt werden. Das Gemisch bei 18 bis 26°C mindestens 10 Minuten stehen lassen, vor der Verwendung mischen und kurz in der Mikrozentrifuge zentrifugieren. Nach der Rekonstitution des Detektionsgemischs und der Positivkontrolle die benötigten Aliquote herstellen und die Lösungen gefroren aufbewahren. Die gefrorenen Komponenten bei 18 bis 26°C etwa 15 bis 30 Minuten lang auftauen, vorsichtig mischen und kurz in der Mikrozentrifuge zentrifugieren (~1.500 – 3.000 × g).

## DNA Extraktion

Der ASFV DNA Mix wurde mittels der unten aufgeführten kommerziellen Extraktionsverfahren validiert. Es können aber auch andere im Labor validierte Extraktions- oder Lyseverfahren verwendet werden.

RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX)  
RealPCR DNA/RNA Spin Column Kit (IDEXX)  
MagMAX Pure- 96 Viral RNA Isolation Kit (Thermo)  
QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)  
High Pure PCR Template Prep Kit (Roche)

Wird der Test nicht sofort nach der DNA-Extraktion durchgeführt, muss die aufgereinigte DNA bei <–15°C aufbewahrt werden. Es wird empfohlen, eine negative Extraktionskontrolle (Scheinprobe) als Probe mitzuführen.

# Testverfahren

## 1 Herstellung des PCR-Gemischs .

- Den aufgetauten DNA MMx durch Schütteln oder mittels Vortexmischer vorsichtig mischen.
- Der DNA MMx ist eine viskose Lösung; immer langsam pipettieren.
- Das PCR Gemisch durch Mischen von 10 µl ASFV DNA Mix und 10 µl DNA MMx herstellen.
- Zur Herstellung des PCR-Gemischs zuerst ASFV DNA Mix und danach DNA MMx in das Röhrchen pipettieren. Mehrmals auf- und abpipettieren, um die MMx-Pipettenspitze zu spülen.
- Die Lösung sanft durch Umdrehen oder auf dem Vortexmischer durchmischen, um sicherzustellen, dass alle Bestandteile gut durchmischt sind.
- Das PCR-Gemisch langsam in die PCR-Platte pipettieren.

Das PCR Gemisch kann bei 2 bis 8°C bis zu 24 h oder bei -25 bis -15°C bis zu 2 Wochen aufbewahrt werden Vor Licht schützen.

## 2 Mit einer Pipette 20 µl des PCR-Reaktionsgemischs in die entsprechende Anzahl von Wells der Multiwell-Platte pipettieren.

## 3 Jedem Well 5 µl der Proben-DNA zugeben. Das endgültige Reaktionsvolumen beträgt 25 µl.

## 4 Für jeden Lauf wird eine PC (5 µl) und eine PCR-Negativkontrolle (5 µl PCR-Wasser) mitgeführt.

## 5 Die Platte abdecken. Falls notwendig, die Platte kurz zentrifugieren, damit sich der Inhalt absetzen kann und Luftblasen entweichen können.

## 6 Den Thermal Cycler mit IDEXX RealPCR Standardeinstellung für DNA/RNA Cycling Programm einrichten.

### Einstellungen für Reporter und Quencher

Target	Reporter	Quencher
ASFV	FAM™	BHQ® (keine)
Interne Kontrolle (ISC/IPC)	HEX™ (VIC)	BHQ (keine)
Passive Referenz	ROX™	entfällt

### RealPCR Standard DNA/RNA Cycling Programm

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Reverse Transkription (RT)	50°C	15 Min	1
Denaturierung	95°C	1 Min	1
Amplifikation**	95°C	15 Sek	45
	60°C	30 Sek	

\*\*Sicherstellen, dass das Instrument richtig eingestellt ist, um die Fluoreszenz nach dem bei 60°C durchgeführten Amplifikationsschritt aufzuzeichnen.

**Hinweis:** Das Cycling Programm kann für den DNA Nachweis ohne den „RT“ Schritt gefahren werden. Es wird jedoch empfohlen, dass der „RT“ Schritt routinemäßig genutzt wird, so dass RNA Tests mühelos in den Arbeitsablauf integriert werden können.



## 7 Analysieren der Daten

Bei Einstellung der Gerätesoftware eine eindeutige Zuordnung zu jedem Target und jeder internen Kontrolle herstellen. Wenn z.B. Target A und Target B auf einer Platte aufgetragen wurden, muss Well A unabhängig von Well B analysiert werden. Anleitungen zur Datenanalyse der Gebrauchsanleitung des jeweiligen Geräts entnehmen. Zur Bestimmung des Schwellenwerts die Auto Ct Einstellung wählen.

- Agilent Mx3000P und Mx3005P– für die Analyse die "background-based threshold fluorescence" Methode benutzen.
- QIAGEN Rotor-Gene-Gerät– die Schwellenlinie in der linearen Phase der exponentiellen Amplifikation manuell über den Hintergrund adjustieren. Das funktioniert am besten mit Logview-Plots und sollte für jeden Reporter des Target-Mix<sup>1</sup> wiederholt werden.
- Applied Biosystems Geräte– in bestimmten Situationen produziert die 'auto threshold' Einstellung keine zufriedenstellenden Resultate. In diesen Fällen ist ein manuelles Adjustieren des Schwellenwerts erforderlich, um die Ct Werte zu ermitteln. Das funktioniert am besten mit Logview-Plots und sollte für jeden Reporter des Target-Mix<sup>1</sup> wiederholt werden.

### Validitätskriterien

	<u>FAM Ct-Wert</u>	<u>HEX (VIC) Ct-Wert</u>
Positive PCR-Kontrolle	<38	<38
Negative PCR-Kontrolle	Kein Signal	Kein Signal

## 8 Interpretation der Ergebnisse.

<u>Testergebnis</u>	<u>FAM Signal</u>	<u>HEX (VIC) Signal</u>	<u>Andere Merkmale</u>
ASFV-DNA positiv	Ja	Ja/Nein	Ein positiver Ct-Wert und eine charakteristische Amplifikationskurve im Vergleich zur PCR Negativkontrolle.  Eine Amplifikationskurve für die interne Kontrolle im HEX (VIC) Kanal ist zu erwarten; es können jedoch einige stark ASFV-positive DNA- Proben ein negatives Ergebnis für die interne Kontrolle aufweisen. <sup>†</sup>
ASFV-DNA negativ	Nein	Ja	Amplifikationskurve im HEX (VIC) Kanal für die interne Kontrolle.
Ungültig <sup>‡</sup>	Nein	Nein	Das Fehlen einer Amplifikationskurve in den FAM und HEX (VIC) Kanälen zeigt ein ungültiges Resultat an.

<sup>†</sup>Die Target-Mix-Reagenzien wurden für die Detektion von ASFV DNA optimiert; eine stark positive DNA Probe kann durch Competition die Detektion der internen Kontrolle verhindern.

<sup>‡</sup>Eine ungültige Probe kann auf eine falsche Probenzugabe, Extraktion und/ oder PCR zurückzuführen sein. Es wird empfohlen die DNA 5-fach in PCR Wasser zu verdünnen und erneut zu testen; die unverdünnte DNA als Probe mitführen. Sollte der Test immer noch ungültig sein wird eine erneute Extraktion empfohlen.

**Technische Unterstützung:**

IDEXX USA Tel: +1 800 548 9997 oder +1 207 556 4895

IDEXX Europa Tel: +800 727 43399

Kontaktieren Sie Ihren lokalen IDEXX-Vertreter oder besuchen Sie unsere Webseite: [idexx.com/contactlpd](https://idexx.com/contactlpd)

\*IDEXX, RealPCR und Test With Confidence sind Marken oder eingetragene Marken der IDEXX Laboratories oder ihrer Tochterunternehmen in den Vereinigten Staaten und/oder in anderen Ländern. Alle anderen Produktnamen, Firmennamen und Logos sind Marken ihrer jeweiligen Eigentümer.

Die in diesem Produkt enthaltenen Farbstoffe werden unter der Lizenz von Biosearch Technologies Inc. verkauft und sind unter US und internationalen Patenten oder Patentanmeldungen geschützt. Die Lizenz erstreckt sich auf veterinär-diagnostische und nicht auf human-diagnostische Anwendungen.

Patentinformationen: [idexx.com/patents](https://idexx.com/patents)

©2022 IDEXX Laboratories, Inc. Alle Rechte vorbehalten.



主选单



打印

中文版

# RealPCR\* ASFV DNA Test

仅供兽医使用

## 名称和用途

RealPCR ASFV DNA检测试剂盒可用于检测从猪(包括野猪)血清、血浆、EDTA-抗凝血、口腔黏液、组织(肺脏、脾脏、肾脏、骨髓、淋巴结、和扁桃体)和棉拭子中提取的ASFV的DNA。可以检测多达20份混合样品。由于混合的稀释效应,当混样中含有单个弱阳性样品时(例如Ct > 32)可能产生阴性结果。

## 概述

非洲猪瘟病毒(ASFV)是引起出血热非洲猪瘟的病原体。它是一种高传染性的病原,可导致疣猪、野猪、软蜱虫的持续感染,引起亚临床症状。作为一种世界卫生组织(OIE)报到的疾病,ASFV对家畜也有高发病率和高死亡率。控制ASFV的爆发依赖于病毒的早期发现。RealPCR ASFV DNA Test提供了一种高敏感性和高特异性的检测方法。

IDEXX RealPCR系统是一种模块化的组合,含有目标特异性的检测混合液、标准化的DNA或RNA的扩增预混液和一管混合的阳性对照。试剂是单独包装和销售的,以便灵活地处理和搭配。

RealPCR DNA Mix (ASFV)包含可以检测ASFV DNA的引物和探针,并配合RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx)一起扩增。该实验的内参样品(ISC)是针对样品中猪内源性DNA而设计,作为整个检测过程的内参样品质控,监控样品的添加、提取和扩增过程。ISC的引物和探针也同时被加入ASFV DNA Mix中。另一个可选的RealPCR Internal Positive Control (IPC $\geq$ v1.2)可用于当内源性宿主DNA在提取后含量较低或几乎没有的情况下。IPC是一段人工合成的猪内参样品DNA序列,因此其能与ASFV DNA Mix相匹配。具体信息请参考说明书"RealPCR Internal Positive Control" ([REF 99-56330](#))。

## 试剂和储存

一般信息	瓶盖颜色	数量	储存		反复冻融次数
		100次实验	收到时	复溶之后	
<b>RealPCR ASFV DNA Mix (ASFV DNA Mix), 冻干</b> <b>[REF] 99-56020</b> 用1 mL PCR 级水进行复溶。避光保存。冻干状态和复溶后的试剂保质期均与瓶体标明的一致。ASFV DNA Mix 试剂管注明的 PC 版本需与检测靶基因混合液一致。例如, PC $\geq$ v1.4指的是靶基因检测预混液使用的 PC 版本必须 $\geq$ 1.4。	绿色	1 x 1.0 mL	-25到8°C	-25到-15°C	$\leq$ 6
<b>RealPCR DNA Master Mix (DNA MMx)</b> <b>[REF] 99-56250</b> 浓缩扩增预混液包含 IDEXX RealPCR 系统中 DNA 扩增需要的热启动聚合酶。DNA MMx 较粘稠-请参考实验步骤部分的处理建议。参比染料 (ROX) 的添加可以校正 PCR 体系的体积差异。请避光保存。	紫色	1 x 1.0 mL	-25到-15°C (长期保存)	N/A	$\leq$ 6
<b>RealPCR Positive Control, 冻干 (PC)</b> <b>[REF] 99-56310</b> 用500 $\mu$ L PCR 级水进行复溶。PC 包含 IDEXX RealPCR 所有检测混合液可检测的目的基因和内参样品的靶基因 (包含 ASFV 目的基因)。冻干状态和复溶后的试剂保质期均与瓶体标明的一致。IDEXX RealPCR 有版本号 (比如v1.3)。当 RealPCR 产品目录增加了新产品时, 新目标基因的序列会添加到 IDEXX RealPCR 中, 相应的 PC 的版本号会进行更新 (比如, v1.3更新为v1.4)。PC 包含一段特异的 IDEXX Signature, 可用于监测工作区域是否有 PC 的污染。若实验室想进行 PC 污染的监测, 可使用 RealPCR PC Tracker DNA Mix。	蓝色	1 x 500 $\mu$ L	-25到8°C	-25到-15°C	$\leq$ 6
<b>RealPCR PCR Grade Water</b> <b>[REF] 99-56350</b> PCR 级水适用于反转录 PCR (RT-PCR)。其可用于试剂的复溶、实验中的阴性对照。在 PCR 工作区域切勿进行不同瓶内 PCR 级水的转移。为避免交叉污染, 不同实验区域请使用不同瓶的水。	无色	2 x 1.0 mL	-25到8°C		N/A

**注意:** 请参阅说明书末页的表格, 了解此试剂盒的说明书和标签上使用的符号的描述。

## 自备器材

- 商品化的 DNA 提取试剂盒
- 可选-带有转子的离心机，适用于多孔板
- 微型离心机 (适用于2 mL离心管，转速可达到1500 – 3000 x g)
- 适当的个人防护装备 (如手套、实验服等)
- 无核酸酶、可阻挡气溶胶污染的移液器吸头
- 准备 PCR mix 的无菌离心管
- 吸头 (5–1000 µL)，包括准备 PCR mix 的专用吸头
- 96孔或384孔 PCR 板和封板膜
- 👁️ • 适用的 Real-PCR 仪器  
(Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® 7500 Fast System (Standard 和 Fast Mode), Applied Biosystems® ViiA™ 7, Applied Biosystems QuantStudio 5, Agilent Mx3000P™, Agilent Mx3005P™, Agilent AriaMx, Bio-Rad CFX96 Touch™, Bio Molecular Systems Mic qPCR Cyclor, QIAGEN Rotor-Gene (仅适用于72孔转子), Roche LightCycler® 480 或其他)。  
**注意：**Roche LC480 仪器需要额外的校准和软件设置。  
IDEXX技术服务可以为上述仪器与RealPCR 试剂的使用提供指导。

## 实验室规范和注意事项

- 请勿使用过期的试剂。
- 整个过程需在无核酸酶的环境下进行。
- 操作试剂和核酸时需带无粉手套。
- 避免交叉污染，移液时使用无核酸酶、带有气溶胶屏障的移液器吸头，并将提取、处理、PCR 设置和 PCR 的试验区域分隔开。

## 冻干试剂的溶解

根据试剂标签说明用 PCR 等级水对 ASFV DNA Mix 和 Positive Control 进行复溶。将试剂在 18到26°C 静置至少10分钟，混匀、瞬时离心后使用。可将溶解后的试剂分装后冷冻保存。当使用冷冻试剂时，在18到26°C静置约15–30分钟进行融化，使用之前轻柔混匀并进行瞬时离心 (1500–3000xg)。

## 👁️ DNA 提取

使用下述商品化提取试剂盒时，ASFV DNA Mix 是有效的。若实验室验证有效，其他的提取试剂盒和裂解方法也是适用的。

RealPCR DNA/RNA Magnetic Bead Kit (IDEXX)  
RealPCR DNA/RNA Spin Column Kit (IDEXX)  
QIAamp Pure- 96 Viral RNA Isolation Kit (Thermo)  
QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)  
High Pure PCR Template Prep Kit (Roche)

若提取后无法立即扩增，可将提纯的DNA放置在<-15°C环境下保存，推荐将阴性提取对照 (模拟样品) 同时作为样本。

## 操作步骤

### 1 PCR Mix 的准备。

- 将融化后的 DNA MMx 颠倒混匀或轻柔地涡旋。
- DNA MMx 是一种粘性溶液，请缓慢吸取。
- PCR Mix 准备：每个反应需要10 µL ASFV DNA Mix 和10 µL DNA MMx。
- 准备 PCR Mix 时，请先在离心管中加入 ASFV DNA Mix，之后再加入 DNA MMx。用吸取 DNA MMx 的吸头反复吹吸几次，确保吸头里的试剂全部打出。
- 将试剂轻柔涡旋，保证混合均匀。
- 缓慢地将 PCR Mix 加入到 PCR 板中。

请在20 min内加入 PCR板，可在2到8°C保存24小时，在-25到-15°C可保存2周。请避光保存。

### 2 在每个孔内加入20 µL PCR Mix。

### 3 在每个样品孔内加入5 µL样品 DNA。反应的终体积是25 µL。

### 4 每次实验需要设立 Positive Control (5 µL) 和 PCR 阴性对照 (5 µL PCR 级水)。

### 5 封板，瞬时离心，并去除孔内气泡。

### 6 根据 IDEXX RealPCR DNA/RNA 循环程序设置。

#### 报告基团和淬灭基团的设置

目标	报告基团	淬灭基团
ASFV	FAM™	BHQ® (无)
内部对照 (ISC/IPC)	HEX™ (VIC)	BHQ (无)
参比基团	ROX™	N/A

#### RealPCR\* 标准 DNA/RNA 扩增程序

	温度	时间	循环
反转录 (RT)	50°C	15 min	1
变性	95°C	1 min	1
扩增**	95°C	15 s	45
	60°C	30 s	

\*\*确保仪器设置成在60°C扩增步骤之后记录荧光信号。

注意- DNA 样品可不进行 RNA"RT" 步骤。但是建议常规进行 "RT" 步骤，如此 RNA 实验可以与 DNA 实验同时进行。

## 7 分析数据

进行仪器软件设置时，为每个目标基因和内参质控设置特定的实验通道。例如，当目标A和B在同一块反应板上时，A反应孔与B反应孔数据必须单独分析。根据仪器使用说明进行数据分析。使用软件默认的Ct设置进行阈值设定。

- 使用 Agilent Mx3000P 和 Mx3005P 进行实验时，确保使用与背景相关的阈值荧光法进行分析。
- Qiagen Rota-Gene 仪器-在指数放大的线性阶段手动调整背景上方的阈值线。这最好在日志视图图上完成，并且应该对目标组合中的每个报告程序重复。
- Applied Biosystems 仪器——在某些情况下，自动阈值设置不会产生令人满意的结果。在这种情况下，需要手动调整阈值来确定Ct值。这最好在日志视图图上完成，并且应该对目标组合中的每个报告程序重复。

### 实验有效标准

	FAM Ct 值	HEX (VIC) Ct 值
阳性对照	<38	<38
PCR 阴性对照	无信号	无信号

## 8 结果判定

样品结果	FAM 信号	HEX (VIC) 信号	其他
ASFV DNA 阳性	有	有/无	与 PCR 阴性对照相比，阳性样品会有Ct值和特异的扩增曲线。 内参质控会在 HEX (VIC) 通道形成扩增曲线；但是某些强阳性 ASFV DNA 样品可能会导致阴性的内参质控结果。 <sup>†</sup>
ASFV DNA 阴性	无	有	HEX (VIC) 内参通道形成扩增曲线。
无效结果 <sup>‡</sup>	无	无	FAM和HEX (VIC) 通道均无扩增曲线预示无效结果。

<sup>†</sup>目标检测混合液已在优化后用于检测ASFV DNA；强阳性的 DNA 样品可能会与内参质控样品形成竞争关系。

<sup>‡</sup>无效结果提示样品添加、提取和\或 PCR 环节可能出现问题。建议用 PCR 级水将 DNA 稀释5倍后，与未稀释的 DNA 样品同时复检。如果实验仍无效，那么需要重新提取 DNA 后实验。

**如需技术支持，请联系：**

IDEXX 美国电话: +1 800 548 9997 or +1 207 556 4895

IDEXX 欧洲电话: +800 727 43399

联系您的 IDEXX 区域经理或经销商或访问我们的网站: [idexx.com/contactlpd](http://idexx.com/contactlpd)

\*IDEXX、RealPCR 和 Test With Confidence 是 IDEXX Laboratories 或其在美国和/或其他国家的关联公司的商标或注册商标。所有其他产品和公司名称及标志均为其各自持有人的商标。











本产品中的染料化合物经 Biosearch Technologies, Inc. 授权销售，并受到美国和世界范围内已颁发或正在申请的专利的保护。该许可证包括兽医申请。不适合人类静脉注射。

专利信息: [idexx.com/patents](http://idexx.com/patents)

©2022 IDEXX Laboratories, Inc. 保留所有权利。



**Symbol Descriptions / Descriptions des symboles / Descrições do símbolos / Opisy symboli  
 Descripciones de los símbolos / Symbol-Beschreibungen / Descrizione dei simboli / 标志描述**

	Batch Code (Lot) / Numéro de lot / Código de lote (Lote) / Kod partii / Número de Partida (Lote) Chargenbezeichnung (Ch.-B.) / Codice del lotto (partita) / 批次
	Serial Number / Numéro de série / Número de série / Numer seryjny Número de serie / Seriennummer / Numero di serie / 序列号
	Catalog Number / Numéro de catalogue / Número de catálogo / Numer katalogowy Número de catálogo / Katalognummer / Numero di catalogo / 货号
	Authorized Representative in the European Community Représentant agréé pour la Communauté européenne Representante autorizado na Comunidade Européia Upoważniony przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej Representante autorizado en la Comunidad Europea Autorisierte EG-Vertretung Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea 欧洲共同体授权代表
	Use by date / À utiliser avant la date / Data de Vencimento / Użyć przed Usar antes de / Verwendbar bis / Usare entro / 此日期前使用
	Date of manufacture / Date de fabrication / Data de Fabricação / Data produkcji Fecha de fabricación / Herstellungsdatum / Data di produzione / 生产日期
	Manufacturer / Fabricant / Fabricante / Wytwórca Fabricante/ Hersteller / Ditta produttrice / 厂商
	Temperature limitation / Limite de température / Limite de temperatura Limite de temperatura / Zakres temperatur / Zulässiger Temperaturbereich Limite di temperatura / 温度限值
	Consult instructions for use / Consulter la notice d'utilisation Consulte instruções para o uso / Sprawdź w instrukcji obsługi Consultar las instrucciones de uso / Gebrauchsinformation beachten Consultare le istruzioni per l'uso / 咨询使用说明
	Major change in the user instructions Modification majeure du mode d'emploi Modificações importante nas instruções de uso Większe zmiany w instrukcji wykonania Modificación importante en el manual de instrucciones Wesentliche Änderung der Gebrauchsinformation Modifica importante nell'inserto tecnico 说明书主要改动的地方

IDEXX Laboratories, Inc.  
One IDEXX Drive  
Westbrook, Maine 04092  
USA

*Manufacturer*  
IDEXX Montpellier SAS  
326 rue de la Galéra  
34090 Montpellier  
France

*EU-Representative*  
IDEXX Europe B.V.  
P.O. Box 1334  
2130 EK Hoofddorp  
The Netherlands

[idexx.com](http://idexx.com)

**IDEXX**