



Листівка-вкладка

Набір діагностичний «Bioscore® ВАЧС» для виявлення ДНК вірусу африканської чуми свиней методом ПЛР у реальному часі.

Показання до застосування:

Набір діагностичний «Bioscore® ВАЧС» призначений для виявлення ДНК вірусу африканської чуми свиней (African swine fever virus, ASFV) методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (ПЛР-РЧ). Біологічним матеріалом для екстракції ДНК слугує кров, сироватка та тканини представників видів *Sus domestica*, *Sus scrofa* (свійські та дикі свині). Екстракція ДНК з біологічного матеріалу проводиться разом з ДНК неконкурентного внутрішнього контролю (ВК), а дуплексна мультиплексна система забезпечує одночасну детекцію двох мішеней – ДНК вірусу АЧС та ВК.

Для *in vitro* діагностики у ветеринарній медицині.

Увага! При підготовці зразків для дослідження, необхідно дотримуватись заходів, що попереджають забруднення навколишнього середовища, керуючись при цьому діючою інструкцією, щодо профілактики і боротьби з африканською чумою свиней, а також Державними санітарними нормами і правилами «Організації роботи лабораторії при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами».

Склад:

Набір діагностичний «Bioscore® ВАЧС» для виявлення ДНК вірусу африканської чуми свиней методом ПЛР у реальному часі на 100 реакцій об'ємом 25 мкл. До складу набору входять наступні компоненти:

ПЛР-РЧ суміш	– 2 пробірки об'ємом по 1 мл
Taq ДНК-полімераза	– 1 пробірка об'ємом 0,015 мл
НКЗ (негативний контрольний зразок)	– 1 пробірка об'ємом 0,5 мл
ПКЗ (позитивний контрольний зразок)	– 1 пробірка об'ємом 0,5 мл
ВК (внутрішній контроль)	– 1 пробірка об'ємом 0,5 мл

Всі компоненти набору зберігаються за температури від -18 до -240С.

Увага! Для використання діагностичного набору «Bioscore® ВАЧС» лабораторія має відповідати вимогам Державних санітарних норм і правил «Організація роботи лабораторії при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами», бути оснащеною відповідним обладнанням та витратними матеріалами для проведення ПЛР у реальному часі та мати акредитацію згідно ДСТУ ISO/IEC 17025:2017 «Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій».

Етапи проведення діагностики:

1. Екстракція ДНК з досліджуваного матеріалу.

Екстракцію ДНК з біологічного матеріалу проводять за використання будь якого комерційного набору згідно інструкції виробника. Процедура валідації набору діагностичного «Bioscore® ВАЧС» для виявлення ДНК вірусу африканської чуми свиней методом ПЛР у реальному часі проводилася за допомогою комерційних наборів MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (Applied Biosystems, Кат. № A32702) та QIAamp cadof Pathogen Mini Kit (Qiagen, Кат. № 54104).

Перед початком процедури екстракції ДНК додати у кожен пробірник з лізуючим буфером, включно з негативним контролем виділення (НКВ), по **5 мкл** внутрішнього контролю (ВК). Далі внести досліджувані зразки у кількостях передбачених методикою екстракції ДНК, ретельно перемішати та проводити подальшу процедуру екстракції згідно інструкції до набору.

Після завершення процедури екстракції ДНК необхідно перевірити її чистоту за допомогою спектрофотометру шляхом визначення співвідношення довжин хвиль А260/230, яке має впадати у діапазон 1,8-2,0.

Увага! Допускається зберігання виділених зразків ДНК протягом одного тижня за температури +4-+8°C та до одного року за температури ≤ -18°C.

2. Проведення процедури ПЛР-РЧ

Розморозити всі компоненти діагностичного набору, за виключенням Taq ДНК-полімерази, ретельно перемішати та осадити краплини короточасним центрифугуванням на вортексі.

Увага! Уникати потрапляння прямих сонячних променів на компоненти діагностичного набору. Розморожені компоненти тримати за кімнатної температури лише протягом часу необхідного для приготування реакційної суміші.

Реакційну суміш готувати із розрахунку **19,85 мкл** ПЛР-РЧ суміші та **0,15 мкл** Taq ДНК-полімерази у розрахунку на один зразок. Доцільно готувати суміш більше ніж на п'ять реакцій. Суміш ретельно перемішати на вортексі, краплини осадити короточасним центрифугуванням. У відібрані ПЛР пробірки (стриповані пробірки, лунки планшету), враховуючи пробірки під НКЗ і ПКЗ, рознести по **20 мкл** реакційної суміші. Використовуючи одноразові наконечники з аерозольним бар'єром внести по **5 мкл** ДНК досліджуваних зразків, а в пробірки для контролю ПЛР по **5 мкл** контрольних зразків.

Увага! Згідно вимог ДСТУ ISO 17025 при проведенні досліджень методом ПЛР-РЧ з кожного зразку екстрагується ДНК у двох повторностях, кожна з яких також аналізується у двох повторностях.

Прилад для проведення ПЛР-РЧ програмується згідно з інструкцією виробника, під час програмування враховуються наступні параметри:
- об'єм реакційної суміші 25 мкл;

- функція пасивного референтного барвника ROX™ відключена;
- детектори флуоресценції обрані згідно таблиці 1;

Таблиця 1

Назва мішені	Канали флуоресценції
Вірус АЧС	FAM/green
ВК	VIC/Yellow

- температурний профіль режиму ампліфікації згідно таблиці 2;

Таблиця 2

Етап	Цикли	Температура	Час
1	1	95	3 хв
2	40	95	15 сек
3		58*	40 сек

*Рівень флуоресценції вимірюється за каналами FAM/green та VIC/Yellow на етапі 3

Набір діагностичний «Bioscore® ВАЧС» було валідовано для роботи з лінійкою приладів - QuantStudio 5 (Applied Biosystems), Rotor-Gene (Qiagen), CFX96 (Bio-Rad).

3. Облік та інтерпретація результатів аналізу

Облік результатів ПЛР-РЧ аналізу проводиться за наявності або відсутності графіків ампліфікації та значень порогового циклу (Ct), що їм відповідає. За каналом FAM/green реєструються данні, що відповідають ВАЧС, за каналом VIC/Yellow – ВК. Обробка отриманих даних здійснюється згідно інструкції до приладу, порогова лінія (threshold line) встановлюється окремо для кожного каналу.

Результати аналізу вважаються достовірними, якщо контрольні зразки відповідають критеріям наведеним у таблиці 3:

Таблиця 3

Контрольні зразки	ВАЧС (FAM/green)	ВК (VIC/Yellow)
НКЗ	Ct ≥ 38	Ct ≥ 38
ПКЗ	Ct ≤ 35	Ct ≤ 35
ВК	Ct ≥ 38	Ct ≤ 35

Інтерпретація результатів ПЛР-РЧ аналізу щодо виявлення ДНК вірусу африканської чуми свиней проводиться згідно таблиці 4:

Таблиця 4

ВАЧС мішень (FAM/green)	ВК (VIC/Yellow)	Результат
Ct < 38	Ct ≤ 35	ВАЧС виявлено
Ct ≥ 38	Ct ≤ 35	ВАЧС не виявлено
Ct ≥ 38	Ct > 35	Сумнівний результат

У випадку виникнення сумнівного результату необхідно провести аналіз повторно починаючи зі стадії екстракції ДНК.

4. Додаткова інформація

Термін придатності діагностичного набору 12 місяців з дати виготовлення, за умови належного зберігання всіх компонентів. Умови зберігання за температури від -24°C до -18°C. Дозволяється короткочасне зберігання (протягом 1-2 діб)

діагностичного набору за температури від +2°C до +4°C при транспортуванні.

Назва та адреса виробництва: ТОВ «БІОКОР ТЕХНОЛОДЖІ ЛТД»: 01133, м. Київ, вул. Петра Болбочана, 4-а. Телефон/Факс: (044) 490-47-00, E-mail: info@biocor-tech.com

Виробник гарантує придатність діагностичного набору протягом всього терміну придатності при дотриманні умов зберігання, транспортування та використання. Якщо діагностичний набір не відповідає вимогам листівки-вкладки або виникли ускладнення, застосування цієї серії негайно припиняють і повідомляють Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) та постачальника (виробника). Одночасно з посланцем у ДНКІБШМ направляють, відповідно до «Вказівки про порядок пред'явлення рекламаций на біологічні препарати, що призначені для застосування у ветеринарній медицині» від 03.06.98 №2 три нерозкриті флакони цієї серії наборів за адресою: 03151 м. Київ, вул. Донецька 30, ДНКІБШМ.