

**MATERIAŁY SZKOLENIOWE
DLA
ZAKŁADÓW HIGIENY
WETERYNARYJNEJ
W ZAKRESIE LABORATORYJNEJ
DIAGNOSTYKI
AFRYKAŃSKIEGO POMORU ŚWIŃ**



Puławy 2013

Opracowanie:

Prof. dr hab. Iwona Markowska-Daniel,

mgr inż. Kinga Urbaniak,

mgr inż. Edyta Kozak,

dr Andrzej Kowalczyk

SPIS TREŚCI

Real-Time PCR

4-7

ELISA

8-10

Real-Time PCR

(wg. Kinga i wsp.)

Przygotowanie próbek do badań

Materialy:

- Jałowy bufor PBS
- Nożyczki i pincety chirurgiczne
- Waga
- Pipetor
- Probówka typu Falcon o pojemności 50ml
- Pipety serologiczne o pojemności 10ml
- Homogenizator z nożami
- Stelaż na probówki

Wykonanie:

1. Do etapu izolacji DNA należy użyć pełnej krwi i/lub homogenizatu tkankowego.
2. Z próbek narządów wyciąć skrawki o masie 0,5-2 gramów.
3. Wycięte skrawki umieścić w jałowej, plastikowej probówce ze stożkowym dnem i uzupełnić jałowym PBS w takiej objętości, aby uzyskać 10% rozcier (homogenizat).
4. Zawartość probówki poddać homogenizacji stosując homogenizator mechaniczny.
5. Uzyskany rozcier (homogenizat) zwirować przez 5 minut w 13000rpm.
6. Supernatant użyć bezpośrednio do izolacji materiału genetycznego wirusa ASF lub przetrzymać w temp. -70°C do czasu dalszych analiz.

Izolacja materiału genetycznego

Materialy:

- Zestaw do izolacji DNA: QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN, nr kat.: 51306
- Etanol 96-100%
- Końcówki o pojemności 20 μl , 200 μl , 1000 μl
- Pipety automatyczne o objętości 2-20 μl , 20-200 μl , 100-1000 μl
- Probówki o pojemności 1,5ml
- Stelaż na probówki

Wykonanie:

1. Izolację DNA prowadzić w pomieszczeniu A.
2. Do probówki o pojemności 1,5ml wprowadzić:
 - 20 μl proteinazy K
 - 200 μl materiału badanego
 - 200 μl AL Buffer
3. Wymieszać zawartość przez worteksowanie nie dłużej niż 15 sekund.

4. Inkubować w temp. 56°C przez 10 minut. Dłuższa inkubacja nie powoduje zmian w wydajności i czystości uzyskanego DNA.
5. Zwirować próbki nie dłużej niż 5 sekund 8000rpm.
6. Dodać 200µl 96-100% etanolu.
7. Wymieszać zawartość przez worteksowanie nie dłużej niż 15 sekund.
8. Przenieść mieszaninę do próbówki z kolumną.
9. Wirować 1 minutę 8000rpm, w temp. otoczenia. Czynność powtórzyć w przypadku niecałkowitej elucji.
10. Umieścić kolumnkę w nowej próbówce zbiorczej i na suchą kolumnkę nanieść 500µl AW1 Buffer.
11. Wirować 1 minutę 8000rpm, w temp. otoczenia.
12. Umieścić kolumnkę w nowej próbówce zbiorczej. Dodać 500µl AW2 Buffer.
13. Wirować 3 minuty 14 000rpm, w temp. otoczenia.
14. Umieścić kolumnkę w nowej próbówce zbiorczej i wirować 1 minutę przy maksymalnych obrotach, w temp. otoczenia.
15. Umieścić kolumnkę w czystej próbówce zbiorczej do przechowywania DNA.
16. Dodać 200µl AE Buffer lub 200µl wody wolnej od nukleaz.
17. Inkubować w temp. pokojowej nie dłużej niż 5 minut.
18. Wirować 1 minutę 8000rpm, w temp. otoczenia.
19. Uzyskany przesącz użyć bezpośrednio do reakcji PCR lub przechowywać w temperaturze -20°C (±5°C).

Amplifikacja materiału genetycznego

Materialy:

- Zestaw do testu PCR: QuantiFast Probe PCR +ROX Vial Kit, QIAGEN nr kat.: 204354; przechowywać w temp. -20°C.
- Startery (20pmoli/µl); przechowywać w temp. -20°C:
 - King-s: 5'CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA3'
 - King-a: 5'GATACCACAAGATCGGCCGT3'
- Sonda TaqMan (20pmoli/µl); przechowywać w temp. -20°C:
 - FAM-5'CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG3'-TAMRA
- Kontrola dodatnia testu PCR; przechowywać w temp. -20°C.
- Aparat do reakcji PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR)
- Końcówki o pojemności 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl
- Pipety automatyczne o objętości 1-10µl, 2-20µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000µl
- Probówki do testu Real-Time PCR o pojemności 0,2ml
- Stelaż na próbówki

Wykonanie:

1. Mieszaninę reakcyjną przygotować w pokoju B w próbówce o objętości 1,5ml. Przed dodawaniem do mieszaniny wszystkie reagenty muszą być rozmrożone i wymieszane.

2. W pomieszczeniu C mieszaninę reakcyjną rozlać po 18 μ l do probówek o objętości 0,2ml.
3. W komorze laminarnej z wyłączonym obiegiem powietrza do probówek zawierających mieszaninę reakcyjną wprowadzić 2 μ l DNA poszczególnych próbek. Końcowa objętość wynosi 20 μ l.
4. Przygotowaną próbkę wstawić do bloku grzejnego termocyklera.
5. Nastawić program amplifikacji.

Skład mieszanin reakcyjnych

Woda	6,95 μ l
2x QuantiFast Probe PCR Master Mix	10 μ l
Starter King-s	0,4 μ l
Starter King-a	0,4 μ l
Sonda TaqMan	0,25 μ l

Końcowa objętość na 1 próbkę	18 μ l
------------------------------	------------

Stałe wartości składników mieszaniny podane powyżej mnoży się przez liczbę badanych próbek z uwzględnieniem jednej więcej np. 5 μ l \times (n+1), gdzie n oznacza liczbę próbek.

Warunki amplifikacji

Etapy	Temperatura	Czas	Liczba cykli
1	95°C	3 minuty	1
2	95°C	10 sekund	40
	58°C	30 sekund	

Interpretacja wyniku

Test Real-Time PCR do wykrywania materiału genetycznego wirusa ASF jest ważny, jeśli wartość Ct kontroli dodatniej wynosi ≤ 38 , a w reakcji z próbą kontrolną ujemną obserwuje się brak wartości Ct lub Ct > 38 .

ELISA

(Ingezim PPA Compact, Ingenasa)

Materialy:

- Zestaw do wykrywania obecności przeciwciał dla wirusa afrykańskiego pomoru świń: Ingenazim PPA compac, Ingenasa, nr kat.: 1.1.PPA.K.3/5 – skład:
 - Mikropłytki opłaszczony antygenem wirusa afrykańskiego pomoru świń 2 lub 5 szt.
 - Dodatnia surowica kontrolna 1 x 1,0 ml
 - Ujemna surowica kontrolna 1 x 1,0 ml
 - Koniugat (koncentrat 100x) 1 x 0,35 ml
 - Płyn do płukania (koncentrat 25x) 1 x 125 ml
 - Rozcieńczalnik (DE01-1) 1 x 125 ml
 - Substrat (Chromogen) – zależnie od liczby płytek 1 x 30/60 ml
 - Roztwór hamujący 1 x 60 ml
- Końcówki
- Pipety o objętości
- Woda III klasy czystości
- Ciepłarka
- Czytnik do ELISA

Wykonanie:

1. Doprowadzić wszystkie odczynniki z wyjątkiem koniugatu do temperatury otoczenia (18°C – 25°C).
2. Jeśli tylko część mikropłytki będzie wykorzystana należy odciąć część folii pokrywającej mikropłytkę i wyjąć wymaganą liczbę pasków.
3. Określić wymaganą objętość płynu do płukania. Rozcieńczyć 1:25 koncentrat płynu stosując wodę III klasy czystości (1 część koncentratu plus 24 części wody). Płyn ten można przechowywać w temp. 5°C.
4. Rozlać po 50 µl/dołek rozcieńczalnika do dołków przeznaczonych do badania surowic badanych oraz kontrolnych.
5. Dodać po 50 µl nierozcieńczonych próbek i surowic kontrolnych do odpowiednich dołków (ujemna surowica kontrolna: A1-A2, dodatnia surowica kontrolna: B1-B2, badane próbki (T): T1 w C1-C2, T2 w D1-D2, T3 w E1-E2 itd.). Końcowe rozcieńczenie próbek i surowic kontrolnych = 1:2.
6. Wymieszać delikatnie, ale dokładnie zawartość dołków.
7. Zakryć mikropłytkę i pozostawić na okres 1 godziny (inkubacja) w temperaturze 37°C.
8. Po inkubacji usunąć ostrożnie zawartość dołków, aby nie doszło do kontaminacji sąsiadujących ze sobą dołków. Wlać do każdego z nich po ok. 300 µl płynu do płukania (unikając tworzenia bąbelków powietrza). Czynność tę powtórzyć czterokrotnie. Pozostałość płynu do płukania odsączyć na bibule.
9. Rozcieńczyć koniugat 1:100 stosując rozcieńczalnik.
10. Rozlać po 100 µl/dołek rozcieńczonego koniugatu, zakryć mikropłytkę i inkubować przez 30 minut w temperaturze 37°C.
11. Płukać 5-krotnie, jak opisano w punkcie 8.
12. Rozlać po 100 µl/dołek substratu, zakryć mikropłytkę i inkubować przez 15 minut (±5 minut) w temperaturze otoczenia (18°C - 25°C).
13. Dodać po 100 µl/dołek roztworu hamującego.

14. Wyniki należy odczytywać w automatycznym czytniku mikroplitek, stosując filtr o długości fali 450 nm, w czasie do 5 minut od dodania roztworu hamującego.

Walidacja testu

Test uznaje się za prawidłowo wykonany, jeśli średnia arytmetyczna OD surowicy kontrolnej ujemnej (OD NC) jest co najmniej 4-krotnie wyższa od średniej arytmetycznej OD surowicy kontrolnej dodatniej (OD PC).

$$\frac{\text{OD NC}}{\text{OD PC}} \geq 4$$

Interpretacja wyników

Należy obliczyć wartość graniczną wg. poniższego wzoru:

Dodatnia wartość graniczna = $\text{NC} - [(\text{NC} - \text{PC}) \times 0,5]$

Ujemna wartość graniczna = $\text{NC} - [(\text{NC} - \text{PC}) \times 0,4]$

Wyniki:

wynik dodatni - gdy średnia arytmetyczna OD badanej surowicy jest niższa niż dodatnia wartości graniczna

wynik ujemny - gdy średnia arytmetyczna OD badanej surowicy jest wyższa niż ujemna wartości graniczna

wynik wątpliwy - gdy średnia arytmetyczna OD badanej surowicy jest zawarta pomiędzy wartością graniczną dodatnią i ujemną

W przypadku, gdy z badaną próbką uzyska się wynik wątpliwy wówczas próbkę tę bada się ponownie.

Jeśli z badaną powtórnie próbką uzyska się ponownie wynik wątpliwy zleca się powtórne pobranie próbki od tego samego zwierzęcia i poddaje się ją badaniu.

Jeśli ponowne pobranie próbki nie jest możliwe lub badanie nowej próbki uzyskanej od tego samego zwierzęcia wykaże po raz kolejny wynik wątpliwy, taką próbkę należy zbadać innymi metodami, zgodnie z zaleceniami Podręcznika diagnostycznego (Decyzja Komisji 2003/422/EC) oraz podręcznika OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, rozdział „African swine fever”.