



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Ветбиохим»
А.В. Кривонос

«15» сентября 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению Тест-системы
для обнаружения патогенных лептоспир
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

I ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Тест-система для обнаружения патогенных лептоспир методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

1.2 Тест-система состоит из 3 наборов и рассчитана на проведение 50 анализов, включая контрольные образцы.

№	Наименование	Количество	Упаковка
Набор I - для выделения ДНК			
1	Раствор-1	12,0 мл	1 флакон
2	Раствор-2	18,0 мл	2 флакона
3	Раствор-3	12,0 мл	1 флакон
4	Раствор-4	12,0 мл	1 флакон
5	Сорбент	2,0 мл	1 пробирка
6	Деионизованная вода	2,0 мл	1 пробирка
Набор II - для выявления ДНК патогенных лептоспир методом ПЦР			
1	Тaq-полимераза	0,03 мл	1 пробирка
2	Положительный контроль (рекомбинантная культура лептоспир)	0,2 мл	5 пробирок
3	Положительный контроль ДНК лептоспир	0,03 мл	1 пробирка
4	Праймеры для ПЦР-1 Лепто	0,27 мл	1 пробирка
5	Праймеры для ПЦР-2 Лепто	0,27 мл	1 пробирка
6	Буфер для ПЦР-1	0,9 мл	1 пробирка
7	Буфер для ПЦР-2	0,9 мл	1 пробирка
8	Минеральное масло	5,0 мл	1 флакон
Набор III - для проведения электрофореза (на 5 гелей по 10 образцов)			
1	Агароза	5 г	1 пакет
2	Концентрат буфера для электрофореза	20,0 мл	1 флакон
3	Бромистый этидий	0,15 мл	1 пробирка

Тест-система предназначена для выявления 15 наиболее распространенных серогрупп *Leptospira interrogans* в инфицированных клеточных культурах и материале от животных (кровь, моча, лимфоузлы, фрагменты почек, печени, селезенки павших животных и абортированных плодов).

1.3 Упаковка и маркировка

Компоненты тест-систем расфасованы в полипропиленовые флаконы с завинчивающимися крышками вместимостью 30 мл, 20 мл и 13 мл, пробирки вместимостью 0,5-2,0 мл. На пробирки и флаконы наклеена этикетка с указанием краткого названия компонента.

Наборы I, II и III отдельно упакованы в полиэтиленовые пакеты. На каждый пакет с

компонентами наборов наклеена этикетка с указанием организации-производителя и/или товарного знака, наименования набора, номера серии и контроля, даты изготовления, срока годности, условий хранения.

Наборы I и III, упакованные в полиэтиленовые пакеты, вложены в картонную или пластиковую коробку. На каждой коробке наклеена этикетка или нанесены несмываемой краской следующие обозначения: страна, город, название организации-производителя и/или товарный знак, полное название тест-системы, номер серии и контроля, дата изготовления (месяц, год), срок годности (месяц, год), предупредительная надпись «Для ветеринарного применения», количество анализов и обозначение ТУ. В каждую коробку вложена инструкция по применению тест-системы.

1.4 Условия хранения и транспортирования

Наборы I и III необходимо хранить при температуре от 2⁰С до 25⁰С, Набор II – при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С.

Транспортирование Набора I и III проводить при температуре от 2⁰С до 25⁰С. Набор II транспортировать при температуре от 2⁰С до 6⁰С (во льду) в теплоизолирующей упаковке (термос, пенопластовая коробка). При получении тест-систему необходимо разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Тест-систему следует хранить в местах, недоступных для детей.

Срок годности тест-системы: 12 месяцев от даты изготовления. Запрещается использовать тест-систему по истечении срока годности.

Флаконы и пробирки без этикеток, с нарушением целостности, изменением консистенции или цвета компонентов, при наличии плесени или других примесей и не использованные в течение срока годности подлежат выбраковке. Обеззараживание биоматериала и реагентов проводят, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, флаконы, наконечники) на 20-24 ч в специальный контейнер, содержащий 0,2% раствор ДП-2Т или аналогичные.

II ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

2.1 В основе ПЦР лежит многократное повторение циклов денатурации исследуемой ДНК, гибридизации ДНК со специфическими праймерами и синтеза с них комплементарных цепей ДНК с помощью термостабильной ДНК-полимеразы. В результате амплификации концентрация синтезированного фрагмента в исследуемой пробе увеличивается в миллионы раз, что позволяет визуально учитывать результаты анализа с помощью электрофореза в агарозном геле.

2.2 Для детекции лептоспир применяется двухступенчатая (т.н. «гнездовая») модификация метода ПЦР с использованием внутренних и внешних праймеров. Праймеры предназначены для определения 15 серовариантов *Leptospira interrogans*.

III ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

При выполнении исследований следует соблюдать условия и требования МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

3.1 Подготовка к работе

3.1.1 Необходимые условия успешного проведения анализа

Строго соблюдать условия хранения и транспортировки компонентов тест-системы (см. п. 1.4).

Однократно использовать пластиковую посуду. Ранее использованные и мытые наконечники и пробирки использовать нельзя.

На всех этапах анализа в первую очередь проводить манипуляции с отрицательным контролем, затем с исследуемыми образцами и в последнюю очередь с положительным контролем.

Посуда для отбора образцов биоматериала должна быть одноразовой или тщательно обработана хромовой смесью, отмыта, стерилизована.

Перед открыванием пробирок капли жидкости на крышках удалять центрифугированием.

При открывании пробирок избегать случайного касания руками или инструментами внутренней поверхности крышек.

На всех стадиях обработки биоматериала удаление супернатанта производить одноразовыми пластиковыми наконечниками при помощи водоструйного насоса в колбу-ловушку с дезинфицирующим раствором (3% хлорамин или 5% перекись водорода и т. п.).

Бромистый этидий разлагается на свету и при нагревании, содержащие его растворы необходимо хранить в темном месте. При длительном хранении или многократном нагревании в растворы, содержащие бромистый этидий, перед употреблением следует внести свежую порцию бромистого этидия (5 мкл на 100 мл буфера).

3.1.2 Подготовка исследуемого материала

Отбор и доставку проб в лабораторию производят согласно ГОСТ 25386-91 « Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики лептоспироза».

- **КРОВЬ:** пробы цельной крови должны быть обязательно консервированы 3-6%-ным раствором ЭДТА или 3,8%-ным раствором цитрата натрия. Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта. Пробирки с цельной кровью смешанной с антикоагулянтом хранить и транспортировать при температуре от 2⁰С до 8⁰С не более 12 часов. Не допускается замораживание образцов цельной крови. Для выделения ДНК использовать 200 мкл образца, помещенного в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

- **МОЧА:** пробы мочи хранить и транспортировать при температуре от 2⁰С до 8⁰С не более 10-12 часов, при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С не более 7 суток. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Перенести 200 мкл образца мочи в полипропиленовую пробирку на 1,5 мл и использовать для выделения ДНК.

- **ОРГАНЫ:** для исследования использовать фрагменты лимфоузлов, почек, печени, селезенки, помещенных в пробирки с физиологическим раствором. Образцы хранить и транспортировать при температуре от 2⁰С до 8⁰С не более 12 часов, при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С не более 7 суток. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Образец органа измельчить стерильными ножницами или растереть в физиологическом растворе или в фосфатном буфере (приготовить примерно 10% суспензию). Для выделения ДНК использовать 200 мкл готовой суспензии, помещенной в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

- **КОНТРОЛИ:** использовать положительные и отрицательные контроли на этапе выделения ДНК (п. 3.2) и постановки ПЦР (п.3.3). Положительным контролем этапа выделения служит рекомбинантная культура лептоспир, положительным контролем этапа ПЦР служит ДНК лептоспир. Пробирку положительного контроля этапа выделения размораживать непосредственно перед использованием, повторной заморозке не подлежит. Для выделения использовать 200 мкл положительного контроля. Выделенную ДНК (5 мкл) использовать для проведения ПЦР. Пробирку с положительным контролем этапа ПЦР размораживать непосредственно перед использованием, в ПЦР использовать 5 мкл.

В качестве отрицательного контроля использовать 200 мкл деионизованной воды.

Положительные контроли хранить при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С, размораживать непосредственно перед использованием.

3.2 Выделение ДНК

Выделение ДНК из исследуемого биологического материала проводить с помощью **Набора I - для выделения ДНК.**

3.2.1 Обработка проб раствором-1.

Внимание! На данном этапе положительный контроль не используется.

- Отобрать и маркировать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный («К-») контроль выделения.

- Внести в каждую подготовленную пробирку для исследуемых образцов и «К-» по 200 мкл раствора-1.
- В подготовленные пробирки с раствором-1 внести по 200 мкл образцов биологического материала и «К-» в следующей последовательности:
 1. В пробирку, маркированную «К - », внести 200 мкл деионизованной воды;
 2. В соответствующие пробирки внести по 200 мкл исследуемых проб;
- Поместить пробы в термостат, инкубировать при температуре 95°C в течение 15 минут. **Примечание:** чтобы избежать самопроизвольного открывания пробирок при нагревании, следует придавить их сверху грузом или использовать специальные пробирки с защелкой.

3.2.2 Выделение ДНК (на данном этапе включается положительный контроль (рекомбинантная культура лептоспир)).

- Отобрать и маркировать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, **включая положительный («К+»)** и отрицательный («К-») контроля выделения.
- В случае образования кристаллов в растворе-2 и растворе-3, прогреть их при температуре от 60 до 65°C до полного растворения.
- Внести в каждую пробирку по 600 мкл раствора-2.
- Пробирку с сорбентом встряхнуть на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента. В каждую пробирку с раствором-2 внести по 40 мкл ресуспендированного сорбента.
- Инкубированные пробы с раствором-1 центрифугировать в настольной центрифуге типа “Эппендорф” 2 минуты при максимальных оборотах. После центрифугирования надосадочную жидкость перенести в подготовленные пробирки с раствором-2 и сорбентом, а осадок отбросить. Вначале перенести «К-», затем исследуемые пробы. Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.
- В пробирку, маркированную «К+», внести 200 мкл положительного контроля.
- Перемешать пробы на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента.
- Инкубировать 10 минут при комнатной температуре (20±2)°C, каждые 3 минуты перемешивая пробы на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента.
- Осадить сорбент центрифугированием на микроцентрифуге в течение 15 сек при максимальных оборотах. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, используя отдельный наконечник для каждой пробы.
- К осадку добавить 100 мкл раствора-3, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Перемешать пробы на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента. Осадить сорбент центрифугированием на микроцентрифуге в течение 15 сек при максимальных оборотах. Удалить надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Процедуру повторить еще раз.
- К осадку добавить 100 мкл раствора-4, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Перемешать на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента. Осадить сорбент центрифугированием на микроцентрифуге в течение 15 сек при максимальных оборотах. Удалить надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Процедуру повторить еще раз.
- Осадок подсушить в течение 10 минут при 56°C, крышки у пробирок должны быть открыты.
- Добавить к осадку 30 мкл деионизованной воды, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Перемешать на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования осадка.
- Инкубировать пробы 10 минут при 56°C в закрытых пробирках, каждые 3 минуты перемешивая их на смесителе типа “Vortex”. Центрифугировать в течение 1 мин при максимальных оборотах. Надосадочная жидкость содержит выделенную ДНК и предназначена для проведения ПЦР. Рекомендуется проводить ПЦР сразу после получения

выделенных ДНК-проб. Допускается хранение проб во льду или в холодильнике при температуре не выше 6⁰С не более 15 минут.

- При необходимости длительного хранения, следует очень осторожно, не взмучивая сорбент, отобрать надосадочную жидкость в отдельные маркированные одноразовые пробирки. Если сорбент взмутился, осадить его центрифугированием. Вначале отобрать «К-», затем исследуемые пробы, затем «К+». Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером. Выделенные пробы заморозить при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С и хранить не более 7 суток. Размораживать непосредственно перед использованием в ПЦР (п. 3.3), не допускается многократное размораживание проб.

3.3 Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Для проведения ПЦР использовать **Набор II - для выявления ДНК патогенных лептоспир методом ПЦР.**

3.3.1 ПЦР-1

Отобрать и маркировать необходимое количество пробирок с учетом положительных («К+», «К+ПЦР») и отрицательных («К-») контролей. Используются выделенный положительный контроль (рекомбинантная культура лептоспир) и положительный контроль ДНК лептоспир.

В отдельной пробирке приготовить общую реакционную смесь на n+1 проб (n – количество проб с учетом положительных и отрицательных контролей). Реактивы внести в количестве и последовательности, указанной в таблице 1. Все реактивы **кроме Таq-полимеразы** должны быть прогреты при комнатной температуре до полного растворения кристаллов льда.

Перед открыванием пробирок рекомендуется осадить капли со стенок и крышек кратким центрифугированием (5-10 сек). Таq-полимеразу добавить в последнюю очередь, при составлении смеси следует держать ее во льду, нагревание не допускается.

таблица 1

Реактив	Кол-во на 1 пробу (мкл)	Кол-во на n+1 проб (мкл)
Буфер для ПЦР-1	15,25	15,25 x (n+1)
Праймеры для ПЦР-1 Лепто	4,5	4,5 x (n+1)
Таq-полимераза	0,25	0,25 x (n+1)

Смесь перемешать пипетированием, избегая образования пены, и немедленно внести по 20 мкл в маркированные пробирки. В каждую пробирку добавить по 2-3 капли минерального масла (примерно 40 мкл).

В подготовленные пробирки с реакционной смесью внести под слой масла по 5 мкл проб в следующей последовательности:

- В пробирку, маркированную «К - » внести 5 мкл отрицательного контроля;
- В соответствующие пробирки внести по 5 мкл исследуемых проб;
- В пробирку, маркированную «К+» внести 5 мкл выделенного положительного контроля (рекомбинантной культуры лептоспир);
- В пробирку, маркированную «К+ПЦР» внести 5 мкл положительного контроля ДНК лептоспир.

Для каждого образца использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.

Запустить на амплификаторе программу:

94⁰С - 5 мин – 1 цикл

94⁰С - 30 сек
55⁰С - 30 сек
72⁰С – 30 сек } 25 циклов

72⁰С – 5 мин – 1 цикл

Когда температура в ячейках достигнет 94⁰С (режим паузы) поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Пробы, полученные после проведения ПЦР-1, можно хранить в течение 24 часов при комнатной температуре, в течение 72 часов при температуре от 2°C до 8°C и длительно при температуре от минус 18°C до минус 20°C.

3.3.2 ПЦР-2

После проведения ПЦР-1 (амплификации) провести ПЦР-2 (реамплификацию) аналогично п. 3.3.1, используя смесь для ПЦР-2 (таблица 2).

таблица 2

Реактив	Кол-во на 1 пробу (мкл)	К-во на n проб (мкл)
Буфер для ПЦР-2	15,25	15,25 x (n+1)
Праймеры для ПЦР-2 Лепто	4,5	4,5 x (n+1)
Тақ-полимераза	0,25	0,25 x (n+1)

Смесь перемешать, избегая образования пены, и немедленно внести по 20 мкл в подготовленные пробирки. В каждую пробирку добавить по 2-3 капли минерального масла (40 мкл).

В маркированные пробирки с реакционной смесью для ПЦР-2 перенести под слой масла по 5 мкл образцов, полученных после проведения стадии ПЦР-1 (вначале перенести отрицательный контроль, затем исследуемые образцы, затем положительные контроли).

Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.

Запустить на амплификаторе программу:

94°C - 5 мин – 1 цикл

94°C - 30 сек	} 25 циклов
55°C - 30 сек	
72°C - 30 сек	

72°C – 5 мин – 1 цикл

Когда температура в ячейках достигнет 94°C (режим паузы) поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Пробы, полученные после проведения ПЦР-2, можно хранить в течение 24 часов при комнатной температуре, в течение 72 часов при температуре от 2°C до 8°C и длительно при температуре от минус 18°C до минус 20°C.

IV УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Результаты исследования следует учитывать путем анализа продуктов амплификации исследуемых образцов методом электрофореза в агарозном геле, используя **Набор III - для проведения электрофореза.**

4.1 Приготовление 1 л рабочего буфера для электрофореза: к 980 мл дистиллированной воды добавить 20 мл концентрата буфера для электрофореза и 40 мкл бромистого этидия.

Буфер можно приготовить самостоятельно по следующей прописи: навеску 4,04 г Триса растворить в 200 мл дистиллированной воды, добавить 1,14 мл ледяной уксусной кислоты и 2 мл 0,5 М раствора ЭДТА рН 8,0 и довести объём буфера до 1000 мл дистиллированной водой. После растворения компонентов буфера добавить 40 мкл раствора бромистого этидия.

4.2 Приготовление агарозного геля

В колбу из термостойкого стекла насыпать 2 г агарозы и добавить 100 мл рабочего буфера для электрофореза (п.4.1), перемешать вращением колбы и поместить в микроволновую печь или на водяную баню, нагревать до полного расплавления агарозы. Расплавленную агарозу охладить до 45-55°C, осторожно вращая колбу. Охлажденную агарозу залить в специальную форму, установить гребенки, не касаясь дна формы. Расстояние между гребёнками должно быть не менее 4 см, толщина геля около 0,5 см. После полного застывания геля гребёнки аккуратно вынуть, подложку с готовым гелем перенести в аппарат для горизонтального электрофореза (например, ПГ-9 “Диа - М”, Россия), залить рабочим буфером для электрофореза, что бы он полностью

покрывал всю поверхность геля. Гель должен располагаться лунками ближе к отрицательному электроду.

4.3 Электрофорез продуктов амплификации

Выставить в штатив пробирки с полученными пробами после проведения ПЦР-2. Из каждой пробирки, из-под слоя масла, аккуратно отобрать 10 мкл амплификационной смеси и последовательно внести в лунки геля. Внимание! Амплификационная смесь уже содержит краситель. Дополнительное смешивание амплификационной смеси с красителем не требуется. Каждой пробирке соответствует одна лунка геля. В каждом ряду лунок обязательно должны присутствовать положительные контроли («К+» и «К+ПЦР»).

Электрофорез проводить при напряжении 8-10 В/см длины геля. **Краситель должен пройти не менее половины длины геля. Направление движения образцов в геле от “-” к “+”!**

4.4 Учет результатов электрофореза

Результаты электрофореза просматривать в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на приборе "Трансиллюминатор". Результаты реакции выявляются в виде светящихся красноватых полос.

Положительными следует считать пробы, полосы в которых располагаются в геле точно на таком же расстоянии от старта, что и полосы положительных контролей. В отрицательном контроле не должно выявляться никаких полос.

Исследуемые пробы следует считать отрицательными, если в них не выявлено никаких полос или полосы не соответствуют по размеру фрагменту в контрольных пробах (т. е. располагаются на другом расстоянии от старта). Размер фрагментов после проведения ПЦР – **180 п.н.**

Присутствие в отрицательном контроле окрашенных фрагментов на уровне полос положительного контроля свидетельствует о перекрестной контаминации в процессе анализа. Результаты аннулируются. Анализ необходимо провести заново, приняв меры для ликвидации контаминации.

V МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

5.1 Бромистый этидий является мутагеном, проникающим через кожу. При работе с ним использовать одноразовые перчатки.

5.2 Ультрафиолет вызывает ожоги кожи и слизистой оболочки глаз. При просмотре гелей пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской.

5.3 Работу с химическими компонентами и биологическим материалом следует проводить с соблюдением правил техники безопасности. При случайном попадании компонентов на кожу или слизистые оболочки рекомендуется промыть это место большим количеством водопроводной воды.

Инструкция разработана ООО «Ветбиохим». Организация-производитель – ООО «Ветбиохим». Адрес производства: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д.16