



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Ветбиохим»
А.В. Кривонос
«14» сентября 2018 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Тест-системы для выявления вируса африканской чумы свиней методом полимеразной цепной реакции (комплектация универсальная)
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва, ул. Гамалеи, д.16)

I ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Тест-система для выявления вируса африканской чумы свиней методом полимеразной цепной реакции.

1.2 Тест-система состоит из 3 наборов и рассчитана на проведение 50 анализов, включая контрольные образцы (таблица 1).

Таблица 1

№	Наименование	Количество	Упаковка
Набор I – для выделения ДНК			
1	Раствор-1	18,0 мл	2 флакона
2	Раствор-2	12,0 мл	1 флакон
3	Раствор-3	12,0 мл	1 флакон
4	Сорбент	2,0 мл	1 пробирка
5	Деионизованная вода	2,0 мл	1 пробирка
Набор II – для выявления ДНК вируса АЧС методом ПЦР			
1	Тақ-полимераза	0,015 мл	1 пробирка
2	Буфер для ПЦР	0,9 мл	1 пробирка
3	Праймеры для ПЦР АЧС	0,27 мл	1 пробирка
4	Положительный контроль выделения АЧС (ПКВ АЧС)	0,2 мл	5 пробирок
5	Положительный контроль АЧС (ПК АЧС)	0,03 мл	1 пробирка
6	Отрицательный контроль (ОК)	0,03 мл	1 пробирка
7	Минеральное масло	5,0 мл	1 флакон
Набор III – для проведения электрофореза (на 5 гелей по 10 образцов)			
1	Агароза	5,0 г	1 пакет
2	Концентрат буфера для электрофореза	20 мл	1 флакон
3	Бромистый этидий	0,15 мл	1 пробирка

Тест-система предназначена для выявления вируса африканской чумы свиней в крови, органах и тканях от живых, павших и вынужденно убитых свиней, в готовой мясной продукции, содержащей свинину (колбасные изделия, фарш, полуфабрикаты и т.п.), а также в инфицированных культурах клеток.

1.3 Условия хранения и транспортирования

Набор I и Набор III хранить при температуре от 2 °С до 25 °С, Набор II – при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С.

Транспортирование Набора I и Набора III проводить при температуре от 2 °С до 25 °С. Набор II транспортировать во льду в теплоизолирующей упаковке (термос, пенопластовая коробка). При получении тест-систему 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 необходимо проводить, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, флаконы, наконечники) на 20-24 ч в специальный контейнер, содержащий 0,2% раствор ДП-2Т.

II ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

2.1 В основе метода лежит механизм репликации специфического фрагмента молекулы ДНК исследуемого образца ферментом Таq-полимеразой в присутствии дезоксирибонуклеотидтрифосфатов и специфических олигонуклеотидных затравок (праймеров). Амплификация (количественное увеличение) специфического фрагмента ДНК происходит за счет многократного повторения циклов денатурации, отжига специфических праймеров и синтеза комплементарных цепей ДНК с помощью фермента Таq-полимеразы. Реакционная смесь для ПЦР включает в себя компоненты, необходимые для выявления ДНК АЧС в исследуемом образце.

III ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

3.1 Подготовка к работе

3.1.1 Необходимые условия для успешного проведения анализа:

- Строго соблюдать условия хранения и транспортирования компонентов тест-системы (п.1.3).
- Однократно использовать пластиковую посуду. Ранее использованные и мытые наконечники и пробирки использовать нельзя.
- На всех этапах анализа в первую очередь проводить манипуляции с отрицательными контролями, затем с исследуемыми образцами и в последнюю очередь с положительными контролями.
- Для отбора образцов биоматериала использовать одноразовую посуду или посуду, тщательно обработанную хромовой смесью, отмытую и стерилизованную.
- Перед открыванием пробирок капли жидкости на крышках удалять кратковременным центрифугированием, избегая случайного касания руками или инструментами внутренней поверхности крышек.
- Готовить реакционные смеси и работать с прибором ПЦР следует в одноразовых перчатках.
- 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 и хранение исследуемого материала:

▪ **ЛИМФАТИЧЕСКИЕ УЗЛЫ, СЕЛЕЗЕНКА, МЫШЕЧНАЯ ТКАНЬ, МЯСНАЯ ПРОДУКЦИЯ:** пробы паренхиматозных органов, тканей и мясной продукции отбирать стерильными инструментами в одноразовые пластиковые флаконы. Пробы хранить и транспортировать при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 ч, при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С не более 2 недель. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Приготовить 10% суспензию в стерильном физиологическом растворе или в фосфатно-солевом буферном растворе. Для этого кусочки органов и тканей весом 1-2 г измельчить ножницами и гомогенизировать в стерильном физиологическом растворе или в фосфатно-солевом буферном растворе, используя стерильные фарфоровые ступки и пестики. Для

выделения ДНК использовать 200 мкл готовой суспензии, помещенной в полипропиленовую пробирку объемом 1,5-2,0 мл.

▪ **КРОВЬ:** цельную кровь в объеме 2 мл отобрать в одноразовые пластиковые пробирки с антикоагулянтом (3-6% раствор ЭДТА, 3,8% раствор цитрата натрия и т.п.). Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта. Пробирки с цельной кровью, смешанной с антикоагулянтом, хранить и транспортировать при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 часов. Не допускается замораживание образцов цельной крови. Для исследования использовать 200 мкл цельной крови без предварительной подготовки, помещенной в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

▪ **ИНФИЦИРОВАННАЯ КУЛЬТУРА КЛЕТОК (КК):** для исследования использовать 200 мкл суспензии КК, помещенной в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

▪ **КОНТРОЛЬНЫЕ ОБРАЗЦЫ:** использовать положительные и отрицательные контроли на этапе выделения ДНК (п. 3.2) и постановки ПЦР (п.3.3). Положительными контролями служат генноинженерные препараты, содержащие фрагмент гена поверхностного белка VP73 вируса АЧС. В качестве отрицательных контролей используется деионизованная вода.

▪ На каждые 6 исследуемых проб рекомендуется использовать по одному отрицательному и одному положительному контролю на этапе выделения ДНК (контроль выделения), добавляя к ним по одному отрицательному и одному положительному контролю на этапе проведения ПЦР (контроль ПЦР).

▪ Пробирку с положительным контролем выделения (ПКВ АЧС) размораживать непосредственно перед выделением ДНК. Повторной заморозке положительный контроль не подлежит. Для выделения использовать 200 мкл. Выделенную ДНК (5 мкл) использовать для постановки ПЦР (п. 3.3). Для длительного хранения выделенной ДНК необходимо аккуратно, не захватывая сорбент, отобрать раствор ДНК, перенести его в стерильную пробирку и хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С не более 7 суток, не допуская многократного размораживания. В качестве отрицательного контроля выделения (ОКВ) использовать 200 мкл деионизованной воды.

▪ На этапе проведения ПЦР использовать 5 мкл выделенной ДНК ПКВ АЧС и 5 мкл положительного контроля АЧС (ПК АЧС). Пробирку с положительным контролем АЧС размораживать непосредственно перед использованием в ПЦР. В качестве отрицательных контролей использовать 5 мкл выделенного ОКВ и 5 мкл ОК (деионизованной воды).

Положительные контроли хранить при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С.

3.2 Выделение ДНК

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

▪ В случае образования кристаллов в растворе-1 и растворе-2, прогреть их при температуре от 60 до 65 °С до полного растворения кристаллов;

▪ Отобрать и подписать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая ОКВ и ПКВ АЧС;

▪ Внести в каждую пробирку по 600 мкл раствора-1;

▪ В подготовленные пробирки с раствором-1 внести по 200 мкл образцов биологического материала и контролей в следующей последовательности:

1) В пробирку, маркированную «ОКВ», внести 200 мкл деионизованной воды;

2) В соответствующие пробирки внести по 200 мкл исследуемых проб;

3) В пробирку, маркированную «ПКВ АЧС», внести 200 мкл положительного контроля выделения АЧС.

Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером (фильтром).

▪ Тщательно перемешать пробы на смесителе типа “Vortex”;

▪ Инкубировать пробы 10 минут при комнатной температуре (20±2 °С), перемешивая каждые 3 минуты на смесителе типа “Vortex”;

▪ Отобрать и подписать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный и положительный контроли. Пробирку с сорбентом встряхивать на смесителе типа “Vortex”, до полного ресуспендирования сорбента. В каждую пробирку внести по 40 мкл ресуспендированного сорбента.

▪ Инкубированные пробы центрифугировать в настольной центрифуге типа “Эппендорф” 1 минуту при максимальных оборотах. После центрифугирования надосадочную жидкость перенести в подготовленные пробирки с сорбентом, а осадок отбросить. Вначале перенести ОКВ, затем исследуемые пробы, затем ПКВ АЧС. Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.

▪ Перемешать пробы на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента.

▪ Инкубировать 10 минут при комнатной температуре $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$, каждые 3 минуты перемешивая пробы на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента.

▪ Осадить сорбент центрифугированием в течение 15 сек на микроцентрифуге при максимальных оборотах. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, используя отдельный наконечник для каждой пробы.

▪ К осадку добавить 100 мкл раствора-2, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Перемешать пробы на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента. Осадить сорбент центрифугированием в течение 15 сек на микроцентрифуге 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-3, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Перемешать на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента. Осадить сорбент центрифугированием в течение 15 сек на микроцентрифуге при максимальных оборотах. Удалить надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, используя отдельный наконечник для каждой пробы.

Процедуру повторить еще раз.

▪ Осадок сушить 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 используется для проведения ПЦР (п.3.3).

▪ ПЦР рекомендуется проводить сразу после выделения ДНК из исследуемых проб. **Допускается хранение проб во льду или в холодильнике при температуре не выше 6°C 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 отрицательный контроль, затем исследуемые пробы, затем положительный контроль. Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером. Выделенные ДНК-пробы заморозить при температуре от минус 18°C до минус 20°C и хранить не более 7 суток. Размораживать непосредственно перед использованием в ПЦР, не допускается многократное размораживание – оттаивание проб.

3.3 Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Для проведения ПЦР использовать **Набор II – для выявления ДНК вируса АЧС методом ПЦР.**

Подготовить необходимое количество пробирок с учетом всех положительных и отрицательных контрольных образцов.

В отдельной пробирке приготовить общую реакционную смесь на n+1 образцов, где n – количество проб с учетом отрицательного и положительного контролей выделения, а также отрицательного и положительного контролей ПЦР. Реактивы внести в количестве и последовательности, указанной в таблице 2. Все реактивы, **кроме Таq-полимеразы**, должны быть прогреты при комнатной температуре до полного растворения кристаллов льда.

Таq-полимеразу добавить в последнюю очередь. Перед открыванием пробирки с Таq-полимеразой рекомендуется осадить капли с крышки и стенок кратким центрифугированием (5-10 сек). **При составлении смеси Таq-полимеразу следует держать во льду. Нагревание Таq-полимеразы не допускается.**

Таблица 2

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

Смесь перемешать, избегая образования пены. Осадить капли с крышки и стенок пробирки кратковременным центрифугированием. Немедленно внести по 20 мкл смеси в подготовленные 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:

- 1) в пробирку, маркированную «ОК» внести 5 мкл отрицательного контроля ОК;
- 2) в пробирку, маркированную «ОКВ» внести 5 мкл выделенного контроля ОКВ;
- 3) в соответствующие пробирки внести по 5 мкл выделенной ДНК исследуемых образцов;
- 4) в пробирку, маркированную «ПКВ АЧС» внести 5 мкл выделенного ПКВ АЧС;
- 5) в пробирку, маркированную «ПК АЧС» внести 5 мкл ПК АЧС.

Для каждого образца использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером. Запустить на амплификаторе программу:

95 °С – 5 мин	1 цикл
95 °С – 15 сек	} 40 циклов
62 °С – 30 сек	
72 °С – 30 сек	
72 °С – 7 мин	1 цикл

Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы) поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

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

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 1л 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, 2 мл 0,5 М раствора ЭДТА pH 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 °С, 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 (п. 3.3). Из каждой пробирки, из-под слоя масла, аккуратно отобрать 10 мкл амплификационной смеси и последовательно внести в лунки геля. Амплификационная смесь уже содержит краситель. Дополнительное смешивание амплификационной смеси с красителем не требуется. Каждой пробирке соответствует одна лунка геля. В каждом ряду лунок обязательно должен присутствовать положительный контроль.

Электрофорез проводить при напряжении 8-10 В/см длины геля. **Пробы должны пройти не менее половины длины геля. Направление движения проб в геле от от “-“ к “+“!**

4.4 Учет результатов электрофореза

Результаты электрофореза просматривают в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на приборе "Трансиллюминатор". Результаты амплификации выявляются в виде светящихся красноватых полос (рис.1).

Размер фрагментов после проведения ПЦР – 257 п.н. В лунках ОКВ и ОК не должно выявляться никаких полос.

Положительными следует считать пробы, полосы в которых располагаются в геле точно на таком же расстоянии от старта, что и полосы положительных контролей.

Отрицательными следует считать пробы, в которых не выявлено никаких полос или полосы не соответствуют по размеру фрагментам положительных контролей (т. е. располагаются на другом расстоянии от старта).

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

V МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

5.1 Работу с химическими компонентами и биологическим материалом следует проводить с соблюдением правил техники безопасности. Работать необходимо в перчатках. 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.