



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Ветбиохим»
А.В. Кривонос
«15» сентября 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

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

I ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Тест-система для обнаружения парвовируса свиней методом полимеразной цепной реакции.

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	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 парвовируса свиней методом ПЦР			
1	Таг- полимераза	0,015 мл	1 пробирка
2	Положительный контроль ПВС	0,2 мл	5 пробирок
3	Праймеры для ПЦР ПВС	0,27 мл	1 пробирка
4	Буфер для ПЦР	0,9 мл	1 пробирка
5	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 обнаружения парвовируса свиней методом полимеразной цепной реакции в крови, сыворотке крови, органах и тканях абортированных плодов, павших и вынужденно убитых животных, а также в сперме и в инфицированных культурах клеток.

1.3 Упаковка и маркировка

Компоненты тест-системы расфасованы в полипропиленовые флаконы с завинчивающимися крышками вместимостью 30 мл, 20 мл и 13 мл, пластиковые пробирки с завинчивающимися крышками 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 разработчика 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 типографским способом следующие обозначения: наименование предприятия-изготовителя, полное наименование тест-системы, количество анализов, номер серии и контроля, дата изготовления, срок годности, условия хранения, обозначение СТО, надпись «Для ветеринарного

применения». В каждую упаковку вложена инструкция по применению тест-системы.

1.4 Условия хранения и транспортирования

Наборы I и III следует 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 во льду в теплоизолирующей упаковке (термос, пенопластовая коробка). При получении тест-систему необходимо разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Срок годности тест-системы: 12 месяцев от даты изготовления.

Запрещается использовать тест-систему по истечении срока годности.

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

Флаконы и пробирки без этикеток, с нарушением целостности, изменением консистенции или цвета компонентов, при наличии плесени или других примесей и неиспользованные 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 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 Анализ по выявлению парвовируса свиней включает выделение суммарной ДНК, амплификацию специфического фрагмента ДНК в полимеразной цепной реакции и электрофорез в агарозном геле.

III ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

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 и хранение исследуемого материала:

- **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 24 часов. Не допускается замораживание образцов цельной крови. Для выделения ДНК использовать 200 мкл образца, помещенного в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.
- **СЫВОРОТКА КРОВИ:** сыворотку крови отобрать в одноразовые пластиковые пробирки и хранить при температуре от 2⁰С до 8⁰С не более 5 суток, при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С не более 30 суток. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Для выделения ДНК использовать 200 мкл сыворотки крови без предварительной подготовки, помещенной в полипропиленовую пробирку объемом 1,5-2,0 мл.
- **СПЕРМА:** сперму отобрать в одноразовые пластиковые пробирки и хранить при температуре от 2⁰С до 8⁰С не более суток, при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С не более недели. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Для исследования использовать 200 мкл образца, помещенного в полипропиленовую пробирку объемом 1,5-2,0 мл.
- **ОРГАНЫ:** пробы паренхиматозных органов и тканей отобрать стерильными инструментами в одноразовые пластиковые флаконы. Пробы хранить и транспортировать при температуре от 2⁰С до 8⁰С не более 24 ч, при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С не более 2 недель. 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 объемом 1,5-2,0 мл.
- **КОНТРОЛИ:** использовать положительные и отрицательные контроли на этапе выделения ДНК (п. 3.2). Рекомендуется использовать по одному положительному и одному отрицательному контролю на каждые 8 исследуемых проб. Для выделения использовать 200 мкл положительного контроля ПВС. Пробирку с положительным контролем ПВС (культура клеток, инфицированная парвовирусом свиней) размораживать непосредственно перед выделением. Повторной заморозке положительный контроль не подлежит. 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 18⁰С до минус 20⁰С не более 7 суток, не допуская многократного размораживания.

В качестве отрицательного контроля выделения использовать 200 мкл деионизированной воды.

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

3.2 Выделение ДНК.

Для выделения ДНК из исследуемого биологического материала использовать **Набор I - для выделения ДНК.**

- Отобрать и маркировать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая положительный («К+») и отрицательный («К-») контроли выделения.
- В случае образования кристаллов в растворе-1 и растворе-2, прогреть их при температуре от 60 до 65⁰С до полного растворения.
- Внести в каждую подготовленную 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 «К-», внести 200 мкл деионизированной воды;
 - 2) В соответствующие пробирки внести по 200 мкл исследуемых проб;
 - 3) В пробирку, маркированную «К+» внести 200 мкл положительного контроля ПВС.
- Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.
- Перемешать пробы на смесителе типа "Vortex".

- Инкубировать пробы 10 минут при комнатной температуре ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$), каждые 3 минуты перемешивая на смесителе типа “Vortex”.
- Отобрать и маркировать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая «К+» и «К-». Пробирку с сорбентом встряхнуть 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 отрицательный контроль, затем исследуемые пробы, затем положительный контроль. 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 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 (п. 3.3). Рекомендуется проводить ПЦР сразу после получения выделенных ДНК-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 проб.

3.3 Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Для проведения ПЦР использовать **Набор II - для выявления ДНК парвовируса свиней методом ПЦР.**

Отобрать и маркировать необходимое количество пробирок с учетом положительных («К+») и отрицательных («К-») контролей.

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	15,25	15,25 x ($n+1$)
Праймеры для ПЦР ПВС	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 выделенных 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 положительного контроля.

Для каждого образца использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.

Запустить на амплификаторе программу:

95⁰С - 5 мин – 1 цикл

95 ⁰ С - 30 сек	} 35 циклов
62 ⁰ С - 30 сек	
72 ⁰ С – 30 сек	

72⁰С – 5 мин 1 цикл

Когда температура в ячейках достигнет 95⁰С (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 2⁰С до 8⁰С и длительно при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С.

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, 2 мл 0,5 М раствора ЭДТА рН 8,0 и довести объем 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 охлаждать до 45-55⁰С, 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. Каждой пробирке соответствует одна лунка геля. В каждом ряду лунок обязательно должен присутствовать положительный контроль ПВС («К+»).

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.

Размер фрагментов положительного контроля после проведения ПЦР – **376 п.н.**

Положительными следует считать пробы, полосы в которых располагаются в геле точно на таком же расстоянии от старта, что и полосы положительного контроля ПВС. 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 контрольной пробе (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 ДНК, приняв меры для ликвидации контаминации.

V МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

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

5.2 Ультрафиолет вызывает ожоги 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