



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Ветбиохим»

А.В. Кривонос

«15» сентября 2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Тест-системы для обнаружения вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней (РРСС) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

I ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Тест-система для обнаружения вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней (РРСС) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

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

№	Наименование	Количество	Упаковка
Набор I - для выделения РНК			
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 РНК вируса РРСС методом ПЦР			
1	Taq -полимераза	0,03 мл	1 пробирка
2	MMLV-ревертаза	0,008 мл	1 пробирка
3	Положительный контроль РРСС	0,2 мл	5 пробирок
4	Праймеры для ПЦР-1 РРСС	0,27 мл	1 пробирка
5	Праймеры для ПЦР-2 РРСС	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 обнаружения вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней (РРСС) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в инфицированных клеточных культурах и материале от животных (кровь, сыворотка крови, сперма, носовые и конъюнктивальные смывы, паренхиматозные органы).

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 СТО. 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 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 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 Анализ по выявлению вируса РРСС включает выделение суммарной РНК, проведение реакции обратной транскрипции и амплификации специфического фрагмента в полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР), реамплификацию 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 транспортирования 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 РНК использовать 200 мкл образца, помещенного в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

- **СЫВОРОТКА КРОВИ:** пробы хранить и транспортировать 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 РНК использовать 200 мкл сыворотки крови, помещенных в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

- **ОРГАНЫ:** для исследования использовать кусочки лимфоузлов, печени, селезенки, помещенные в пробирки с физиологическим раствором. Образцы хранить и транспортировать при температуре от 2⁰С до 8⁰С не более 3 суток, при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С не более 10 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 РНК использовать 200 мкл готовой суспензии, помещенной в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

- **НОСОВЫЕ И КОНЪЮНКТИВАЛЬНЫЕ СМЫВЫ:** ватный тампон (зонд) после отбора материала поместить в стерильную одноразовую пробирку с 0,5 мл стерильного физиологического раствора или фосфатного буфера, пробирку с тампоном плотно закрыть. Образцы хранить и транспортировать при температуре от 2⁰С до 8⁰С не более 3 суток, при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С не более 10 суток. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Для выделения РНК использовать 200 мкл образца, помещенного в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

- **СПЕРМА:** пробы 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 выделения РНК использовать 200 мкл образца, помещенного в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

- **КОНТРОЛИ:** использовать положительные и отрицательные контроли на этапе выделения РНК (п. 3.2). Рекомендуется использовать по одному положительному и одному отрицательному контролю на каждые 8 исследуемых проб. Пробирку с положительным контролем РРСС (культура клеток, инфицированная вирусом РРСС) размораживать непосредственно перед выделением РНК. Повторной заморозке положительный контроль не подлежит. Для выделения использовать 200 мкл положительного контроля РРСС. Выделенную РНК (5 мкл) использовать для постановки ПЦР (п. 3.3). Для длительного хранения выделенной РНК необходимо аккуратно, не захватывая сорбент, отобрать раствор РНК, 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 использовать 200 мкл деионизованной воды.

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

3.2 Выделение РНК

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

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 деионизованной воды;
 2. В соответствующие пробирки внести по 200 мкл исследуемых проб;
 3. В пробирку, маркированную «К+» внести 200 мкл положительного контроля РРСС.
- 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 максимальном количестве оборотов. После центрифугирования надосадочную жидкость перенести в подготовленные пробирки с сорбентом, а осадок отбросить. Вначале перенести «К-», затем исследуемые пробы, затем «К+». 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 максимальном количестве оборотов. 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 максимальном количестве оборотов. 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 максимальном количестве оборотов. 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 РНК и предназначена для проведения ПЦР (п. 3.3). Рекомендуется проводить ПЦР сразу после получения выделенных РНК-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 РНК-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 выполнения ПЦР использовать **Набор II - для выявления РНК вируса РСС** методом ПЦР.

3.3.1 ПЦР-1

Отобрать и маркировать необходимое количество пробирок с учетом положительных и отрицательных 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 и MMLV-ревертазы** 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 и MMLV-ревертазу добавить в последнюю очередь, при составлении смеси следует держать их во льду, нагревание не допускается.

таблица 1

Реактивы для ПЦР-1	Кол-во на 1 пробу (мкл)	К-во на $n+1$ проб (мкл)
Буфер для ПЦР-1	15,25	15,25 x ($n+1$)
Праймеры для ПЦР-1 РСС	4,5	4,5 x ($n+1$)
Таq-полимераза	0,25	0,25 x ($n+1$)
MMLV-ревертаза	0,125	0,125 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 положительный контроль.

Для каждого образца использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.

Запустить на амплификаторе программу:

50 ⁰ С – 30 мин	}	1 цикл
95 ⁰ С - 5 мин		
95 ⁰ С - 30 сек	}	25 циклов
55 ⁰ С - 30 сек		
72 ⁰ С - 30 сек		
72 ⁰ С - 5 мин		1 цикл

Когда температура в ячейках достигнет 50⁰С (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 2⁰С до 8⁰С и длительно при температуре от минус 18⁰С до минус 20⁰С.

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

Реактивы для ПЦР-2	Кол-во на 1 пробу (мкл)	К-во на $n+1$ проб (мкл)
Буфер для ПЦР-2	15,25	15,25 x ($n+1$)
Праймеры для ПЦР-2 РСС	4,5	4,5 x ($n+1$)
Таq-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 внести под слой масла по 5 мкл образцов, полученных после проведения ПЦР-1 (вначале внести отрицательный контроль, затем исследуемые образцы, затем положительный контроль).

Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.

Запустить на амплификаторе программу:

95⁰С - 5 мин 1 цикл

95 ⁰ С - 30 сек	} 25 циклов
55 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-2, 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 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 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, чтобы он полностью покрывал всю поверхность геля. Гель должен располагаться лунками ближе к отрицательному электроду.

4.3 Электрофорез продуктов амплификации

Выставить в штатив пробирки с продуктами, полученными после проведения ПЦР-2. 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 («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 просматривают в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на приборе "Трансиллюминатор". Результаты реакции выявляются в виде светящихся красноватых полос.

Положительными считают пробы, полосы в которых располагаются в геле точно на таком же расстоянии от старта, что и полосы положительного контроля. В отрицательном контроле не должно выявляться никаких полос. Размер фрагментов после проведения ПЦР-2 – 403 п.н.

Исследуемые пробы считают 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 РНК, приняв меры по 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 компонента 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