

УТВЕРЖДАЮ  
Генеральный директор  
ООО «Ветбиохим»  
А.В. Кривонос  
2016 г.



**ИНСТРУКЦИЯ**  
по применению Тест-системы  
для обнаружения и дифференциации вирусов лейкоза птиц типов А-D и J  
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)  
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

**I ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ**

1.1 Тест-система для обнаружения и дифференциации вирусов лейкоза птиц типов А-D и J методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

1.2 Тест-система состоит из 3 наборов и рассчитана на проведение 100 анализов из 50 образцов, включая контроли.

№	Наименование	Количество	Упаковка
Набор I - для выделения РНК и ДНК			
1	Раствор-1	18,0 см <sup>3</sup>	2 флакона
2	Раствор-2	12,0 см <sup>3</sup>	1 флакон
3	Раствор-3	12,0 см <sup>3</sup>	1 флакон
4	Сорбент	2,0 см <sup>3</sup>	1 пробирка
5	Деионизованная вода	2,0 см <sup>3</sup>	1 пробирка
Набор II - для выявления РНК и ДНК вируса лейкоза птиц и дифференциации типов А-D и J методом ПЦР			
1	Тақ -полимераза	0,030 см <sup>3</sup>	1 пробирка
2	MMLV-ревертаза	0,008 см <sup>3</sup>	2 пробирки
3	Положительный контроль А-D	0,030 см <sup>3</sup>	1 пробирка
4	Положительный контроль J	0,030 см <sup>3</sup>	1 пробирка
5	Праймеры для ПЦР-1	0,27 см <sup>3</sup>	1 пробирка
6	Праймеры для ПЦР-2	0,27 см <sup>3</sup>	1 пробирка
7	Буфер для ПЦР-1	0,9 см <sup>3</sup>	1 пробирка
8	Буфер для ПЦР-2	0,9 см <sup>3</sup>	1 пробирка
9	Минеральное масло	5,0 см <sup>3</sup>	1 флакон
Набор III - для проведения электрофореза(на 10 гелей по 10 образцов)			
1	Агароза	5 г	2 пакета
2	Буфер для электрофореза	20,0 см <sup>3</sup>	2 флакона
3	Раствор бромистого этидия	0,15 см <sup>3</sup>	2 пробирки
	Буфер для нанесения образца на гель	0,3 см <sup>3</sup>	2 пробирки

Тест-система предназначена для обнаружения и дифференциации вируса лейкоза птиц типов А-D и J методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в образцах сывороток крови, органах павших птиц, а также в инфицированных культурах клеток.

1.3 Упаковка и маркировка

Компоненты тест-систем расфасованы в полипропиленовые флаконы с завинчивающимися крышками вместимостью 30 мл, 15 мл и 20 мл, пробирки вместимостью 0,5-2,0 мл. На пробирки и флаконы наклеена этикетка с указанием краткого названия компонента.

Флаконы и пробирки с компонентами каждого набора 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 упакованы 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 животных», номер государственной регистрации, знак соответствия в системе ГОСТ Р, условия хранения, количество анализов и обозначение нормативного документа. В коробку вложена инструкция по применению тест-системы.

#### 1.4 Условия хранения и транспортирования

Наборы I и III необходимо хранить при температуре от 2<sup>0</sup>С до 6<sup>0</sup>С, Набор II – при температуре от минус 18<sup>0</sup>С до минус 20<sup>0</sup>С.

Транспортирование тест-системы проводить в теплоизолирующей упаковке (термос, пенопластовая коробка) при температуре от 2<sup>0</sup>С до 6<sup>0</sup>С. Компоненты Набора II транспортировать во льду.

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.

### II ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

2.1 В основе ПЦР лежит многократное повторение циклов денатурации исследуемой ДНК при температуре 94<sup>0</sup>С, гибридизации ДНК со специфическими праймерами при температуре 51-53<sup>0</sup>С и синтеза с них комплементарных цепей ДНК с помощью термостабильной ДНК-полимеразы при температуре 72<sup>0</sup>С. 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 Поскольку геном вируса лейкоза птиц представлен молекулой РНК, а также ДНК копией, встроенной в геном птицы, полный анализ по его выявлению включает выделение суммарной РНК и ДНК, получение кДНК и амплификацию специфического фрагмента ДНК в совмещенной реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции, 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 кратким 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 хранить в темном месте.** При длительном хранении или многократном нагревании в них перед употреблением следует внести свежую порцию бромистого этидия (5 мкл на 100 мл буфера).

### 3.1.2 Подготовка исследуемого материала

#### 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 2<sup>0</sup>С до 8<sup>0</sup>С не более 24 часов. Не допускается замораживание образцов цельной крови.

Для выделения суммарной РНК и ДНК использовать 200 мкл образца, помещенного в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

- **СЫВОРОТКА КРОВИ:** пробы хранить при температуре от 2<sup>0</sup>С до 8<sup>0</sup>С не более 5 суток, при температуре от минус 18<sup>0</sup>С до минус 20<sup>0</sup>С не более 30 суток. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Для выделения суммарной РНК и ДНК 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 2<sup>0</sup>С до 8<sup>0</sup>С не более 3 суток, при температуре от минус 18<sup>0</sup>С до минус 20<sup>0</sup>С 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 суммарной РНК и ДНК использовать 200 мкл готовой суспензии, помещенной в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

- **КУЛЬТУРЫ:** использовать 200 мкл инфицированной культуры клеток, помещенной в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл. Образцы хранить в замороженном виде при температуре от минус 18<sup>0</sup>С до минус 20<sup>0</sup>С не более 14 суток. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.
- **КОНТРОЛИ:** используются положительные и отрицательные контроли на этапе проведения ПЦР (п. 3.3). Положительными контролями ПЦР служат генноинженерные препараты, содержащие фрагменты геномов вирусов лейкоза птиц А – D и J. В ПЦР-1 (п. 3.3.1) используют положительный контроль А-D, в ПЦР-2 (п. 3.3.2) используют положительный контроль J. Пробирку с положительным контролем размораживают непосредственно перед использованием, в реакцию берут 5 мкл.

В качестве отрицательного контроля используют 200 мкл деионизованной воды на этапе выделения (п. 3.2).

**Положительные контроли хранить при температуре от минус 18<sup>0</sup>С до минус 20<sup>0</sup>С, размораживать непосредственно перед использованием.**

**3.2. Выделение РНК и ДНК** из исследуемого биологического материала проводят с помощью **Набора - I для выделения РНК и ДНК.**

- Отобрать и промаркировать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный («К-») контроль выделения.
- В случае образования кристаллов в растворе-1 и растворе-2, прогреть их при температуре от 60<sup>0</sup>С до 65<sup>0</sup>С 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 отрицательный контроль в следующей последовательности:
  1. В пробирку маркированную «К-» внести 200 мкл отрицательного контроля;
  2. В соответствующие пробирки внести по 200 мкл исследуемых проб;
- Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером (фильтром).
- Перемешать пробы на встряхивателе типа “Vortex”.
- Инкубировать пробы 10 минут при комнатной температуре ( $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), каждые 3 минуты перемешивая на встряхивателе типа “Vortex”.
- Отобрать и промаркировать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая «К-». Пробирку с сорбентом встряхнуть на встряхивателе 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. Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.
- Перемешать пробы на встряхивателе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента.
- Инкубировать 10 минут при комнатной температуре ( $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), каждые 3 минуты перемешивая пробы на встряхивателе 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 встряхивателе 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 встряхивателе 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  $56^{\circ}\text{C}$ , крышки у пробирок должны быть открыты.
- Добавить к осадку 30 мкл деионизованной воды, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Перемешать на встряхивателе типа “Vortex” до полного ресуспендирования осадка.
- Инкубировать пробы 10 минут при  $56^{\circ}\text{C}$  в закрытых пробирках, каждые 3 минуты перемешивая их на встряхивателе типа “Vortex”. Центрифугировать в течение 1 мин при максимальном количестве оборотов. Надосадочная жидкость содержит выделенную суммарную РНК и ДНК и предназначена для проведения ПЦР (п. 3.3). Рекомендуется проводить ПЦР сразу после получения выделенных проб. **Допускается хранение проб во льду или в холодильнике при температуре не выше  $6^{\circ}\text{C}$  не более 15 минут.**
- При необходимости длительного хранения, следует очень осторожно, не взмучивая сорбент, отобрать надосадочную жидкость в отдельные промаркированные одноразовые пробирки. Если сорбент взмучился, осадить его центрифугированием. Вначале отобрать отрицательный контроль, затем исследуемые пробы. Для каждой пробы использовать



отдельный наконечник с аэрозольным барьером. Выделенные пробы заморозить при температуре от минус 18<sup>0</sup>С до минус 20<sup>0</sup>С 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 используют **Набор II - для выявления РНК и ДНК вируса лейкоза птиц и дифференциации типов А-D и J методом ПЦР.**

#### 3.3.1 ПЦР-1 А-D

Отобрать и промаркировать необходимое количество пробирок объемом 0,5 мл с учетом положительного («К+ А-D») и отрицательного («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 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 добавлять 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)	Кол-во на n проб (мкл)
Буфер для ПЦР-1	15.25	15.125 x (n+1)
Праймеры для ПЦР-1	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, избегая образования пены, и немедленно раскатать по 20 мкл в предварительно промаркированные пробирки, в каждую пробирку добавить по 2-3 капли 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 выделенного отрицательного контроля;
- В соответствующие пробирки внести по 5 мкл выделенных исследуемых проб;
- В пробирку, маркированную «К+ А-D » внести 5 мкл положительного контроля А-D.

Для каждого образца использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.

Запустить на амплификаторе программу:

50 <sup>0</sup> С – 45 мин } 94 <sup>0</sup> С - 5 мин }	1 цикл
94 <sup>0</sup> С - 0.5 мин } 51 <sup>0</sup> С - 0.5 мин } 72 <sup>0</sup> С - 0.5 мин }	5 циклов
94 <sup>0</sup> С - 0.5 мин } 53 <sup>0</sup> С - 0.5 мин } 72 <sup>0</sup> С - 0.5 мин }	35 циклов

Когда температура в ячейках достигнет 50<sup>0</sup>С (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.

Для того, что бы провести дифференциацию вируса лейкоза типов А-D от вируса лейкоза типа J необходимо провести учет результатов амплификации проб, полученных после проведения ПЦР-1, с помощью электрофореза в агарозном геле (раздел IV «Учет результатов амплификации»). Образцы, показавшие положительный результат и содержащие геном вируса лейкоза птиц подтипа А-D, исследуют в ПЦР-2 на наличие генома вируса лейкоза птиц подтипа J.

### 3.3.2 ПЦР-2 J

Для образцов, положительных в ПЦР-1, провести ПЦР-2 аналогично п. 3.3.1, используя смесь для ПЦР-2 (таблица 2). В качестве «К+» использовать положительный контроль J (5 мкл).  
таблица 2

Реактивы для ПЦР-2	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	4,5	4,5 x (n+1)
Тaq-полимераза	0,25	0,25 x (n+1)
MMLV-ревертаза	0.125	0.125 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 промаркированные пробирки с реакционной смесью для ПЦР-2 внести под слой масла по 5 мкл выделенных образцов (п.3.2), показавших положительный результат в ПЦР-1 А-D, соблюдая ту же последовательность: вначале внести «К-», затем исследуемые образцы, затем 5 мкл положительного контроля J.

Температурный и временной режим программы амплификации такой же, как в ПЦР-1 А-D.

## 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 45-55°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 продуктами амплификации (ПЦР-1 А-D, п. 3.3.1, или ПЦР-2 J, п.3.3.2).

К 7 мкл полученной амплификационной смеси (водной фазы) добавить 3 мкл буфера для нанесения образца, перемешать пипетированием. Полученные образцы внести в лунки агарозного геля, образовавшиеся от зубцов гребёнки.

Каждой пробирке соответствует одна лунка геля. В каждом ряду лунок обязательно должен присутствовать соответствующий положительный контроль.

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 следует считать 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.

Исследуемые пробы 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.

#### Размер фрагментов после проведения ПЦР.

Матрица	Праймеры	Размер фрагментов
Лейкоз птиц типов А-D	Праймеры для ПЦР-1	314 п.н.
Лейкоз птиц типа J	Праймеры для ПЦР-2	738 п.н.

## V МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

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

5.2 Ультрафиолет вызывает ожоги слизистой оболочки глаз. При просмотре гелей пользоваться защитным экраном или очками.

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.

5.4 Запрещается во время работы с компонентами тест-системы прием пищи, воды, курение.

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

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