



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов «ПЦР-Ф-ЛЕПТОСПИРОЗ-ФАКТОР» для
выявления ДНК возбудителей лептоспироза (*Leptospira* spp.) в
биологическом материале, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле**

21.10.60-365-51062356-2022

Для диагностики *in vitro*

Содержание

Список сокращений	3
1. Назначение	4
2. Характеристика набора	4
3. Аналитические характеристики.....	6
4. Меры предосторожности.....	6
5. Материалы и оборудование	6
6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	8
6.1 Отбор материала для исследования, транспортировка и хранение	9
6.2. Подготовка исследуемых проб	9
7. Проведение анализа	9
7.1. Экстракция (выделение) НК из исследуемых проб	10
7.2. Подготовка и проведение ПЦР	10
7.3 Детекция продуктов ПЦР амплификации методом электрофореза в агарозном геле	12
8. Интерпретация результатов анализа	12
9. Условия транспортирования	13
10. Условия хранения	13
11. Срок годности	13
Приложение 1. Приготовление реакционной смеси	14
Приложение 2. Лист вносимых изменений	15

Список сокращений

ВКО	внутренний контрольный образец
К-	отрицательный контроль
ВК-	отрицательный контроль этапа экстракции
К+	положительный контроль
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
НК	нуклеиновая кислота
СП	санитарные правила
МУ	методические указания

1. Назначение

Набор предназначен для выявления ДНК бактерий рода *Leptospira* в клиническом (кровь, моча) и патологическом материале (ткани мозга, легкие, почки от животных), а также в продуктах питания (фарш, колбаса и т.п.) методом амплификации ДНК с последующей электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле.

2. Характеристика набора

2.1 Принцип действия

Набор позволяет специфически амплифицировать фрагмент генома бактерий рода *Leptospira* и ДНК внутреннего положительного контроля (бактериофага Т4) в мультиплексной полимеразной цепной реакции. Детекция продуктов амплификации осуществляется электрофоретически с разделением продуктов амплификации в агарозном геле.

2.2 Состав набора

Набор состоит из комплекта реагентов для проведения мультиплексной ПЦР (комплект № 1) и комплекта контрольных образцов (комплект № 2). Набор выпускается в двух вариантах:

- 1) для анализа 55 образцов (включая контрольные образцы)
- 2) для анализа 110 образцов (включая контрольные образцы).

Состав набора приведен в Таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Состав комплекта №1

№	Состав комплекта	Описание	Объем (мкл.)		Количество пробирок
			На 55 реакций	На 110 реакций	
1	Смесь для проведения ПЦР, ПЦР FLEPTO	прозрачная жидкость зеленого цвета	830	1660	1
2	ДНК Полимераза, TAQ POLYMERASE	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	17	33	1
3	Буфер для разведения ДНК, ДНК БУФЕР	прозрачная бесцветная жидкость	500	1000	1
4	Минеральное масло МИН. МАСЛО	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	2000	2000	1(2)

Таблица 2. Состав комплекта №2

№	Состав комплекта	Описание	Объем (мкл.)		Количество пробирок
			на 55 реакций	на 110 реакций	
1	Внутренний контрольный образец, ВКО T1	прозрачная бесцветная жидкость ¹	550	1100	1
2	Отрицательный контрольный образец, ОКО (ТЕ буфер)²	прозрачная бесцветная жидкость	1500	2000	1
3	Положительный контрольный образец, ПКО FLEPTO	прозрачная бесцветная жидкость	100	200	1

¹ Возможна легкая опалесценция

² Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

В набор не входят реактивы для экстракции нуклеиновых кислот. Выделение ДНК может проводиться, например, с помощью наборов на основе сорбционного метода, в состав которых входит силика или микроцентрифужные колонки, и также наборов на основе фенол-хлороформной экстракции и т.п. Рекомендуется использовать набор «ДНК/РНК-С-ФАКТОР» либо аналогичный.

В набор не входят реактивы для проведения электрофореза в агарозном геле. Для проведения электрофореза рекомендуется использовать набор «ФОРЕЗ-ФАКТОР» или аналогичный.

3. Аналитические характеристики

Показано отсутствие специфических реакций компонентов набора в отношении ДНК других микроорганизмов *Brucella canis*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Candida spp.*

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении образцов ДНК КРС, кошки, собаки, свиньи и человека.

Аналитическая чувствительность набора – не менее 10^3 микробных клеток.

Аналитическая специфичность – набор реагентов реагирует с образцами положительного и внутреннего контролей, а также с пробами, зараженными лептоспирами, и не реагирует с отрицательными контролями и отрицательными пробами (не содержащими ДНК лептоспир).

4. Меры предосторожности

Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб биологического материала от животных осуществлять в строгом соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Исследование проводится в два этапа в отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое.

Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники с аэрозольным барьером.

Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) сбрасывают в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор (например, 0,2% натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты).

Рабочие поверхности в ПЦР помещениях облучают УФ светом в течение 30 минут до начала и после проведения работ. Также после окончания работ

рекомендуется обрабатывать рабочие поверхности дезинфицирующим раствором.

5. Материалы и оборудование

Для зоны выделения ДНК из исследуемых проб:

- Настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВп-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия);
- Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл с диапазоном температур от 25 до 99 °С (например, ТТ-2-«Термит» «НПО ДНК-Технология» Россия);
- Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
- Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс. об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия);
- Вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 20-200 и 200-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 1,5 мл (например, «Ахуген», США);
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и 1000 мкл в штативах (например, «Ахуген», США);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Штативы для микропробирок на 1,5-2 мл (например, «Ахуген», США);
- Емкость с дезинфицирующим средством;
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С.;
- Халат лабораторный;
- Набор для выделения ДНК по п 2.2.

Для зоны проведения ПЦР анализа:

- Амплификатор (например «Терцик», «ДТ 96» ДНК-технология).
- ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», Ламинарные системы, Россия).
- Микроцентрифуга-вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 2- 20, 20-200 мкл и 100-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 20, 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
- Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,2 мл (например, «SSI», США).

- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С;
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 0,2 и 1,5 мл (например, «Ахуген», США);
- Штативы для микропробирок на 0,2 и 1,5-2,0 мл (например, «SSI», США);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Халат лабораторный.

Для зоны электрофоретического анализа

- Реактивы для проведения электрофореза в агарозном геле по 2.2
- Камера для горизонтального электрофореза (например: «SE2», «Хеликон»);
- Источник постоянного тока с напряжением 150-460 В (например: Эльф-4, «ДНК-технология»);
- Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей (например: «Vilber Lourmat»);
- Видеосистема с цифровой камерой для регистрации результатов (например: «Vilber Lourmat»), «Биотест-1»);
- Микроволновая печь для плавления агарозы;
- Колба коническая на 250-300 мл из термостойкого стекла для приготовления агарозы;
- Мерный цилиндр на 1 л для приготовления буфера для электрофореза;
- Штатив для микропробирок на 0,5 и 1,5 мл;
- Отдельная автоматическая пипетка на 10-50 мкл;
- Одноразовые наконечники до 200 мкл;
- Пластиковая емкость на 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромистый этидий;
- Отдельный халат;
- Одноразовые перчатки.

6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб

6.1 Отбор материала для исследования, транспортировка и хранение

Для исследования используют следующий материал:

- Цельная кровь (от животных с острой формой инфекции). Кровь забирается в пробирку с 3-6 % ЭДТА из расчета 50 мкл раствора ЭДТА на 1 мл крови, закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.
- Фрагменты тканей и органов от павших животных (мозг, легкие, почки) отбирают в стерильный контейнер.

- Мочу отбирают в количестве 15–25 мл в специальный сухой стерильный флакон или контейнер. Если нет возможности исследовать материал в течение суток вносят глицерин до 10% от объема, перемешивают и хранят при температуре не выше 16 °С.

- Продукты питания (фарш, мясные полуфабрикаты, сосиски, колбасу и т.п.) отбирают в стерильные контейнеры

Полученные образцы можно транспортировать и хранить в следующих режимах:

Цельная кровь:

- при температуре 2 - 8 °С - в течение 12 ч с момента взятия материала

Другие образцы:

- при температуре 2 - 8 °С - в течение 1 суток;

- при температуре не выше минус 16 °С - в течение 1 недели;

- при температуре не выше минус 68 °С - длительно.

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

6.2. Подготовка исследуемых проб

Пробирку с кровью аккуратно несколько раз переворачивают для равномерного перемешивания.

Исследуемые пробы тканей, органов и продуктов питания измельчают с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, добавляют десятикратный объем стерильного физиологического раствора или фосфатного буфера и тщательно перемешивают. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 2 тыс. об./мин в течение 5-10 минут. Аликвоту надосадочной жидкости (0,1 мл) используют для экстракции ДНК.

Мочу после сбора отстаивают в течение 1 часа, затем осторожно сливают, оставляя придонную часть – около 10 мл. Центрифугируют при 5000-6000 g 10 мин, если осадок практически не виден, то в эту же пробирку вносят еще 10 мл материала и повторяют центрифугирование. Надосадочную жидкость осторожно сливают, оставив над осадком примерно 0,2 мл жидкости. Осадок ресуспендируют в оставшейся надосадочной жидкости и 100 мкл его используют для экстракции НК. До получения осадка мочу нельзя охлаждать или замораживать. Если нет возможности исследовать мочу в течение 24 ч после взятия, в образец вносят глицерин (в количестве 10% от объема пробы), перемешивают и замораживают.

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

7. Проведение анализа

Исследование с помощью набора реагентов «ПЦР-Ф-ЛЕПТОСПИРОЗ-ФАКТОР» состоит из четырех этапов:

- экстракция НК (на этом этапе дополнительно используют реактивы для экстракции, например набор «ДНК/РНК-С-ФАКТОР»);
- проведение ПЦР;
- анализ продуктов амплификации методом электрофореза (на этом этапе дополнительно используют набор реагентов для электрофоретического анализа, например набор «ФОРЕЗ-ФАКТОР»);
- учет результатов анализа.

7.1. Экстракция (выделение) НК из исследуемых проб

Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный контроль выделения. Внести во все пробирки с исследуемыми образцами, включая пробирку для **ОКО**, по 10 мкл **ВКО Т1**.

Внести исследуемые пробы в объеме согласно инструкции к набору для выделения НК, в пробирку отрицательного контроля выделения вместо исследуемой пробы внести **ОКО**³ (пробирку обозначить как **ВК-**).

Выделять ДНК из анализируемых и контрольных образцов согласно протоколу инструкции производителя набора для выделения НК.

Выделенную ДНК можно хранить в течение одной недели при температуре от 2°C до 8°C или в течение года при температуре не выше минус 16°C.

7.2. Подготовка и проведение ПЦР

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.

Успешное прохождение реакции контролируют использованием **ПКО FLEPTO** и **ДНК буфера**.

В отдельной пробирке смешать компоненты набора реагентов из расчета на каждую реакцию⁴:

- 15 мкл **ПЦР СМЕСЬ FLEPTO**;
- 0,3 мкл **TAQ POLYMERASE**

³ Вместо **ОКО** допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

⁴ Объемы реагентов **ПЦР СМЕСЬ FLEPTO** и **TAQ POLYMERASE** на различное количество образцов приведены в Приложении 1

Перемешать смесь на вортексе (без вспенивания) и сбросить капли кратковременным центрифугированием.

Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб. Внести по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.

В случае использования амплификаторов без подогревающейся крышки (например, «Терцик», «ДНК технология») сверху в пробирки внести по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл).

Используя наконечники с фильтром в подготовленные пробирки (под масло или непосредственно на масло) внести:

- а) в пробирку отрицательного контроля ПЦР (К-) 10 мкл **ДНК буфера**;
- б) в ряд пробирок для исследуемых проб - в каждую внести по 10 мкл ДНК соответствующей пробы, полученной по п. 7.1 (включая пробу **ВК-**);
- в) в пробирку положительный контроль ПЦР (К+) – 10 мкл **ПКО FLEPTO**.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-2 секунды). Установить пробирки в амплификатор. Режим термоциклирования приведен в Таблице 3.

Таблица 3. Температурно-временной режим амплификации («Терцик», ДНК технология, ПЦР в пробирках объемом 0,5 мл)

№ п/п	Температурно-временной режим (точный)	Число циклов
1	95°C – 5 мин	1
2	95°C – 20 сек	45
	63°C – 30 сек	
	72°C – 30 сек	
3	72°C – 2 мин	1

После окончания реакции переставить пробирки в специальный штатив и отправить в помещение для детекции продуктов ПЦР.

Пробы после амплификации можно хранить в течение 16 ч при комнатной температуре. Для длительного хранения требуется заморозка.

Анализ продуктов амплификации проводится методом электрофореза в агарозном геле.

7.3 Детекция продуктов ПЦР амплификации методом электрофореза в агарозном геле

Внимание: Работа с амплифицированными продуктами должна производиться в отдельной комнате сотрудником, не производящим манипуляций в чистых помещениях.

Поставить электрофорез исследуемых и контрольных проб согласно инструкции производителя набора для детекции амплифицированной ДНК методом электрофореза в агарозном геле.

8. Интерпретация результатов анализа

Учёт результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной НК.

Результат считается достоверным в случае корректного прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции ДНК в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6. Оценка результатов анализа.

Проба	Полоса электрофореграмме		Результат
	331 п.н.	634 п.н.	
	<i>FLEPTO</i>	<i>BKO</i>	
ПКО К+	есть	есть	Реакции положительного и внутреннего контролей прошли успешно
ДНК буфер К-	нет	нет	Реакция прошла успешно
	есть	нет	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка! Рекомендуется поставить смывы
	нет	есть	Контаминация ВКО! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка! Рекомендуется поставить смывы
ОКО ВК-	нет	есть	Экстракция прошла успешно
	есть	есть или нет	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция! Рекомендуется поставить смывы.
	нет	нет	Результат недостоверный, возможно присутствие ингибиторов. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!
Образцы	есть	есть или нет	Результат анализа положительный. ДНК <i>Leptospira</i> spp. обнаружена
	нет	есть	Результат анализа отрицательный
	нет	нет	Результат не достоверный. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!

В случае, если в ВК- отсутствует полоса ВКО, а в К+ и исследуемых образцах полоса ВКО присутствует – результаты можно считать достоверными. Также в случае полоса ВКО в К+ отсутствует, а в ВК- и образцах присутствует – результаты можно считать достоверными.

ВНИМАНИЕ! При получении сомнительных результатов, а также при появлении любого значения St для отрицательного контроля этапа ПЦР К- (на любом из каналов) рекомендуется исследование смывов с поверхностей в лаборатории для исключения риска внутрилабораторной контаминации. Смывы с лабораторных поверхностей и оборудования используют в качестве матрицы

для ПЦР (вносят в реакцию вместо исследуемых проб в количестве 10 мкл) – то есть смывы исследуют без экстракции. Появление любого значения Ct на любом из каналов свидетельствует о внутрилабораторной контаминации..

9. Условия транспортирования

Набор «ПЦР-Ф-ЛЕПТОСПИРОЗ-ФАКТОР» можно транспортировать всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

10. Условия хранения

Хранение комплектов набора «ПЦР-Ф-ЛЕПТОСПИРОЗ-ФАКТОР» осуществляют при температуре от минус 18 до минус 20°С.

11. Срок годности

Срок годности набора реагентов «ПЦР-Ф-ЛЕПТОСПИРОЗ-ФАКТОР» 12 месяцев.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Приложение 1. Приготовление реакционной смеси

Количество реакций	Объем ПЦР FLEPTO, мкл	Объем TAQ POLYMERASE, мкл
3	45	0,9
4	60	1,2
5	75	1,5
6	90	1,8
7	105	2,1
8	120	2,4
9	135	2,7
10	150	3
15	225	4,5
20	300	6
25	375	7,5
30	450	9
35	525	10,5
40	600	12
45	675	13,5
50	750	15
55	825	16,5

Приложение 2. Лист вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.1 от 26.05.2021	стр. 5, стр. 10	Добавлены сноски, поясняющие, что вместо ОКО допускается использовать физраствор, ТЕ-буфер, дистиллированную воду
Версия 1.2 от 28.12.2021	По тексту	Изменено название ВКО
Версия 1.3 от 24.02.2022	п. 6.2. Подготовка исследуемых проб	Отредактированы рекомендации по пробоподготовке биоматериала
Версия 1.4 от 04.05.2022	Раздел 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	Добавлено: на усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала

По вопросам качества набора реагентов «ПЦР-Ф-ЛЕПТОСПИРОЗ-ФАКТОР» или по вопросам приобретения тест-систем нашего производства, просьба обращаться в ООО «ВЕТ ФАКТОР» по адресу:

108840, Россия, г. Москва, г. Троицк, ул. Промышленная д.2

Тел: 8 (499) 271-71-26, добавочный 243

Email: vet@faktor.ru