

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

В.Г. Акимкин

«28»

гекатерия

2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению тест-системы «ЛПС» для выявления патогенных лептоспир методом полимеразной цепной реакции

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «ЛПС» предназначена для выявления 16S РНК патогенных лептоспир в биологическом материале от животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод выявления 16S РНК патогенных геновидов лептоспир основан на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с РНК **экзогенного внутреннего контрольного образца (ВКО-V)**, проведении реакции обратной транскрипции РНК, амплификации полученной кДНК и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации в режиме «реального времени». ВКО позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами РНК

проводится обратная транскрипция РНК с помощью фермента Ревертазы (MMIV) и амплификация участков кДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Таq-полимеразы.

В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции.

Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1):

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
кДНК-мишень	кДНК ВКО-V	кДНК <i>Leptospira</i>

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данной тест-системы применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения, limit of detection, LOD)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции РНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий/мл
Кровь, ткани внутренних органов, моча	«РИБО-золь-С» + «РИБО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	5×10^3
Кровь, моча	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	5×10^3

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Порядок отбора и подготовки проб».

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность тест-системы доказана при исследовании следующих микроорганизмов: сапрофитный вид *Leptospira biflexa*, *Treponema pallidum*, *Borrelia garinii*, *B.afzelii*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae*; *Brucella suis*; *B.abortus*, *B.ovis*, *B.canis*, *B.melitensis*, *Chlamydia suis*; *Chlamydophila pecorum*, *Ch abortus*, *Ch.felis*; *Haemophilus*

parasuis; *Lawsonia intracellularis*; *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Bordetella bronchiseptica*; *Pasterella multocida*; *Listeria monocytogenes*; *Mycobacterium bovis*, *M.tuberculosis*, *M.avium*; *Escherichia coli*; *Campylobacter jejuni*; *Salmonella choleraesuis*; *Staphylococcus aureus*; *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, а также образцов ДНК человека, свиньи, КРС, собаки, кошки, овцы.

При тестировании образцов вышеперечисленных микроорганизмов и ДНК человека, свиньи, КРС, собаки, кошки, овцы неспецифических реакций выявлено не было.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Форма 1 предназначена для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК, рекомендованные Изготовителем.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций обратной транскрипции и амплификации, включая контроли.

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК участка 16S РНК патогенных лептоспир с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Объем, мл	Количество
ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT <i>Leptospira</i>	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-С	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	0,03	1 пробирка
ТМ-Ревертаза (MMIV)	0,015	1 пробирка
RT-G-mix-2	0,01	2 пробирки
ПКО кДНК <i>Leptospira</i>	0,1	1 пробирка
К-	0,2	1 пробирка
ОКО	1,6	2 пробирки
ПКО <i>Leptospira-rec</i>	0,03	5 пробирок
ВКО-V	0,6	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

Допускается другая фасовка, согласованная в установленном порядке.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Работа должна проводиться согласно правилам МСХиП РФ 27.01.1997 г. № 13-7-2/840 «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения», утвержденным Департаментом ветеринарии.
- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром¹. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания отходов.
- Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты), использованные для гомогенизации, выдерживаются в растворе дезинфицирующего средства (например, 0,2 % раствор

¹ Для удаления жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты) в течение одного часа, моются водопроводной водой с поверхностно-активными моющими средствами и после отмывания в проточной и деионизованной воде высушиваются в сушильном шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Тест-система предназначена для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Тест-система готова к применению согласно данной инструкции. Применять тест-систему строго по назначению.
- Не использовать тест-систему, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать тест-систему по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вредно при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Тест-систему хранить в местах, не доступных для детей.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку², биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в

² Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом от 1,5 до 5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
2. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия, или аналогичный).
3. Вакуумная система забора крови (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия, или аналогичные).

Предварительная подготовка исследуемого материала

4. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; рН=7,5±0,2).
5. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
6. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
7. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
8. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
9. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого

материала.

10. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
12. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
13. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК из исследуемых образцов

14. Комплект реагентов для экстракции РНК – «РИБО-преп» или «Рибо-золь-С» совместно с «Рибо-сорб».
15. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК.

Обратная транскрипция и амплификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

16. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
17. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
18. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
19. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные

- системы», Россия, или аналогичный).
20. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 21. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 22. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие, рекомендованные Изготовителем).
 23. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 24. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
 25. Емкость для сброса наконечников.

ПОРЯДОК ОТБОРА И ПОДГОТОВКИ ПРОБ

Материалом для исследования служат: кровь, моча, тканевой (аутопсийный) материал (ткани мозга, легких, почек), культуры бактерий.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала

При взятии материала используют отдельные инструменты для каждого животного.

Взятие крови проводится в стерильные пробирки с 3 %-ным раствором ЭДТА из расчета 10:1 (или с цитратом натрия в стандартной концентрации). Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.

Моча собирается в стерильную посуду.

Тканевой (аутопсийный) материал (фрагменты органов) помещают в стерильный пластиковый контейнер.

Материалы доставляют в лабораторию в течение суток, сохраняя при температуре от 2 до 8 °С. Допускается хранение образцов цельной крови при температуре от 2 до 8 °С – не более 48 часов, замораживание цельной крови не допускается. Для остальных материалов (за исключением мочи) допускается хранение:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение

1 месяца;

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

Если нет возможности исследовать мочу в течение 24 ч после взятия, она переносится в центрифужную пробирку на 30 мл или «Эппендорф», затем в нее вносят глицерин, 10 % от объема пробы, перемешивают для равномерного распределения глицерина и замораживают при температуре не выше минус 16 °С для хранения в течение 1 месяца или при температуре не выше минус 68 °С в течение более длительного времени.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК

Для получения бактериальной фракции крови пробирку с кровью центрифугируют в течение 10 мин при 1000 g (если кровь стояла при температуре от 2 до 8 °С более 1 ч после ее забора, то пробирку следует аккуратно несколько раз перевернуть для равномерного перемешивания крови). Затем отбирают две пробирки по 1 мл плазмы и центрифугируют ее при 10 000 g в течение 10 мин для концентрирования бактериальных клеток. После этого 900 мкл надосадочной плазмы удаляют наконечником с фильтром в емкость с дезинфицирующим раствором, а осадок и 100 мкл надосадочной жидкости исследуются на наличие 16S РНК лептоспир. Аналогичным образом приготовленный второй осадок хранится при температуре не выше минус 16 °С для повторной экстракции в случае нарушения какого-либо из технологических процессов.

Для исследования мочи используют несколько алгоритмов пробоподготовки.

При наличии центрифуги с охлаждением до 4 °С для пробирок объемом 30 мл и ускорением 9-10 тыс g используется следующий алгоритм пробоподготовки.

Пробу центрифугируют при 9-10 тыс g в течение 10 мин, затем надосадочную жидкость переносят в емкость с дезинфицирующим раствором, оставив в пробирке осадок и 1 мл надосадочной жидкости, после чего осадок ресуспендируют в оставшемся 1 мл надосадочной жидкости и переносят в отдельную пробирку. После чего снова

концентрируют пробу при 10 000 g в течение 10 мин. 900 мкл надосадочной жидкости переносят в емкость с дезинфицирующим раствором, а осадок и 100 мкл надосадочной жидкости используют для экстракции РНК. В случае наличия большого количества солей или слизи, для экстракции РНК в отдельную пробирку переносят 100 мкл надосадочной жидкости и верхний слой клеток, аккуратно снятый с осадка солей.

При отсутствии центрифуги для пробирок объемом 30 мл и ускорением 9-10 тыс g, проводят концентрирование бактерий только из 1 мл мочи как описано выше, используя пробирки на 1,5 мл и центрифугу для пробирок типа «Эппендорф».

Внутренние органы гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, или автоматических гомогенизаторов для биоматериала, затем готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Для экстракции РНК берут 30 мкл суспензии.

Культуры бактерий разводят в 1000 раз стерильным физиологическим раствором или фосфатным буфером. Для экстракции РНК используют 100 мкл полученного разведения.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК и амплификация кДНК (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

Для экстракции РНК используются:

- а) **«РИБО-преп»** – экстракция РНК из крови, осадков мочи, содержащих только эпителиальные клетки и не содержащих соли, культур бактерий;
- б) **«РИБО-золь-С»** – первый этап экстракции РНК из крови, суспензий тканей внутренних органов, осадков мочи (в том числе содержащих соли), культур бактерий. Второй этап экстракции РНК проводится с использованием комплекта **«РИБО-сорб»**.

А. Экстракция РНК при помощи комплекта реагентов «РИБО-преп»

ВНИМАНИЕ! Для работы с РНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Раствор для лизиса (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

В случае экстракции РНК из гомогенатов тканей отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО-V**. Добавить в пробирки по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.

В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО-V** внести по **50 мкл** исследуемых суспензий.

При экстракции из осадков клеток после концентрирования лептоспир непосредственно в исследуемые пробирки с осадками необходимо внести **300 мкл раствора для лизиса** и **10 мкл ВКО-V**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) вносят только **10 мкл ВКО-V** и **300 мкл раствора для лизиса**.

В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **300 мкл раствора для лизиса**, затем добавить **90 мкл ОКО**, **10 мкл ВКО-V** и **10 мкл ПКО *Leptospira-rec***.

Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.

Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.

Процентрифугировать пробирки на центрифуге в течение 5 мин при 13 тыс об/мин.

Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим

штативом, прижать их и переворачивать штатив.

Процентрифугировать при 13 тыс об/мин в течение **2 мин** на центрифуге.

Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

Процентрифугировать при 13 тыс об/мин в течение **2 мин** на центрифуге.

Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).

Добавить в пробирки по **40 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.

Процентрифугировать пробирки при 13 тыс об/мин в течение **1 мин** на центрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

Б. Экстракция РНК при помощи комплектов реагентов «РИБО-золь-С» и «РИБО-сорб»

I этап

В пробирки с исследуемыми осадками крови или мочи, или с тканевым гомогенатом внести по **300 мкл раствора D**, затем **добавить 10 мкл ВКО-V**. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **300 мкл раствора D**, затем **добавить 10 мкл ВКО-V** и **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **300 мкл раствора D**, затем **добавить 90 мкл ОКО**, **10 мкл ВКО-V** и **10 мкл ПКО *Leptospira-rec***. После чего пробы тщательно перемешать на вортексе и прогреть при температуре 56 °С в течение 5 мин, несколько раз перемешивая. После этого пробы необходимо центрифугировать в течение 5 с на вортексе для удаления

капель с внутренней поверхности крышки пробирки. В случае исследования суспензий тканей органов можно на первом этапе в пустые пробирки внести **300 мкл раствора D**, **10 мкл ВКО-V** и затем по **30 мкл** исследуемой пробы.

Добавить к образцам, лизированным в растворе D, **30 мкл раствора E**, перемешать на вортексе и центрифугировать 5 с для сбрасывания капель с крышки пробирки.

В пробирки добавить **300 мкл раствора A**, перемешать на вортексе и центрифугировать 5 с на вортексе для сбрасывания капель с крышки пробирки.

В пробирки добавить **100 мкл раствора B**, перемешать на вортексе в течение 1-2 мин (раствор должен стать молочно-белым), затем поместить пробы на ледяную баню (при температуре от 0 до 4 °С) на 10 мин. После этого центрифугировать пробирки в течение 10 мин при 10 тыс g.

В новые пробирки объемом 1,5 мл внести по **400 мкл лизирующего раствора** и промаркировать соответственно номерам проб.

После центрифугирования раствор должен разделиться на 2 фазы: нижнюю (фенольную), содержащую белки и ДНК, и верхнюю (водную), содержащую РНК. Необходимо аккуратно отобрать верхнюю фазу (400 мкл при экстракции РНК из осадков мочи и гомогенатов внутренних органов, 200 мкл – из осадков крови, 450 мкл при экстракции РНК из ОКО и ПКО), не захватывая нижний слой, и перенести ее в пробирку с лизирующим раствором. Тщательно перемешать смесь.

II этап

Тщательно ресуспендировать **сорбент** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл сорбента**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 1 мин, еще раз перемешать и оставить на 5 мин.

Центрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 7 тыс об/мин в течение 30 с на центрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 30 с при 7 тыс об/мин на центрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя

вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. Процентрифугировать 45 с при 9 тыс об/мин на центрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Повторить отмывку **раствором для отмывки 3**.

Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 4**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе, процентрифугировать 1 мин при 10 тыс об/мин на центрифуге. Полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.

Поместить пробирки в термостат при температуре 56 °С на 10 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

В пробирки добавить по **40 мкл РНК-буфера**, используя свободный от РНКаз наконечник с фильтром. Перемешать содержимое пробирок на вортексе. Поместить в термостат при температуре 56 °С на 5 мин (встряхивая пробы на вортексе каждую минуту). Перемешать на вортексе и процентрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (13 тыс об/мин) в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

Обратная транскрипция, амплификация и детекция продуктов амплификации

Общий объем реакции – 25 мкл, объем РНК-пробы – 10 мкл.

Порядок работы:

А. Подготовка проб для проведения ОТ-ПЦР

Пробирку с **ОТ-ПЦР-смесью-1-FRT *Leptospira*** разморозить, перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке **ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *Leptospira*, ПЦР-буфер-С, полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMIv) и RT-G-mix-2** из расчета на каждую реакцию:

- **10 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-FRT *Leptospira*;**
- **5 мкл ПЦР-буфер-С;**
- **0,5 мкл полимеразы (TaqF);**
- **0,25 мкл ТМ-Ревертазы (MMIv);**
- **0,25 мкл RT-G-mix-2.**

Перемешать смесь на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по **15 мкл** для ОТ-ПЦР.

Используя наконечник с фильтром, в подготовленные пробирки добавить по **10 мкл проб РНК**, полученной в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. **Необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.**

Поставить контрольные реакции:

- а) отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К–) – внести в пробирку 10 мкл К-.**
- б) положительный контроль ОТ-ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО кДНК *Leptospira*.**

Б. Проведение обратной транскрипции, амплификации и детекции продуктов амплификации

Порядок работы с помощью приборов Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) смотрите в Приложении 1.

Порядок работы с помощью приборов iCycler iQ и iCycler iQ5 (Bio-Rad, США) смотрите в Приложении 2.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 15 мес. Тест-система с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Тест-систему транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ОТ-ПЦР-смеси-1-FRT *Leptospira*, ПЦР-буфера-С, полимеразы (TaqF), ТМ-Ревертазы (MMLv) и RT-G-mix-2. ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *Leptospira*, ПЦР-буфер-С, полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMLv) и RT-G-mix-2 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *Leptospira* хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик тест-системы требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество тест-системы «ЛПС» направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru³.

³ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, («Киаген ГмбХ»), Германия)

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6, с приборами Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q - программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения, указаны в следующем порядке: для прибора Rotor-Gene 3000 / для англоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q / для русскоязычной версии программы Rotor-Gene 6000/Q.

А. Проведение ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор и запустить программу Rotor-Gene.

Поместить подготовленные для проведения ОТ-ПЦР пробирки в ротор амплификатора, начиная с ячейки номер 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе), установить ротор в прибор, закрыть крышку. Запрограммировать прибор.

ВНИМАНИЕ! Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*).

- Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**.
- Во вкладке выбрать шаблон запуска эксперимента **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл**. Нажать кнопку **New/Новый**.
- Выбрать тип ротора. Поставить отметку в окошке рядом с надписью **No Domed 0.2 ml Tubes/Locking ring attached/Кольцо закреплено**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**.

- Выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции** – 25 мкл. Для прибора Rotor-Gene 6000 должно быть отмечено окошко **15 μ l oil layer volume/15 μ L объем масла/воска**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**.
- В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.
- Задать следующие параметры эксперимента:

Таблица 3

Программа амплификации *Leptospira*

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold 1/ Удерж. темп-ры 1	50	30 мин	–	1
Hold 2/ Удерж. темп-ры 2	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	20с	–	10
	65	50с	–	
	72	20с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	20с	–	38
	61	50 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	20 с	–	

Нажать дважды кнопку **OK/Да**.

- В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation/Опт.уровня сигн**. В открывшемся окне нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых**, выбрать функцию **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. Для канала **FAM/Green** установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал** – 3FI и **Max Reading/Максим. Сигнал** – 7FI. Для канала **JOE/Yellow** установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал** – 10FI и **Max Reading/Максим. Сигнал** – 20FI (активировать **Edit.../Правка...**, окно **Auto gain calibration channel settings/Авто-оптимизация уровня сигнала**). Окно закрыть, нажав кнопку **Close/Заккрыть**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
- Дать название эксперименту и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты

данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в роторе. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все исследуемые образцы обозначить как **Unknown/Образец**, положительные контроли – **Positive control/Положительный контроль**, отрицательный контроль экстракции – **Negative control/Отрицательный контроль**, отрицательный контроль ОТ-ПЦР – **NTC/ОТР. (ПФ)**. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**.

Б. Анализ результатов

Анализ результатов по каналу JOE/Yellow:

- Нажать в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
- Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
- В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.
- Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала**, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).
- В меню основного окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10 %**.
- В меню **CT Calculation/Вычисление СТ** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.04**.

В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Анализ результатов по каналу FAM/Green провести аналогично анализу результатов по каналу JOE/Yellow в соответствии с настройками, указанными в таблице ниже.

Таблица 4

Канал	Threshold/ Порог	Dynamic tube/ Динамич.фон	Slope Correct/ Коррект. уклона	More Settings/ Outlier Removal/ Устранение выбросов
FAM/Green	0,03	включена	включена	10%
JOE/Yellow	0,04	включена	включена	10%

В. Интерпретация результатов

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла (*Ct*) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 5

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла (<i>Ct</i>) по каналу			Результат
FAM/Green		JOE/Yellow	
Осадки крови и бактериальных культур	Гомогенаты тканей и осадки мочи		
≤ 25	≤ 27	отсутствует	РНК патогенных лептоспир НЕ обнаружена
определено или отсутствует		≤ 32	РНК патогенных лептоспир обнаружена
отсутствует или > 25	отсутствует или > 27	отсутствует или > 32	Невалидный*
≤ 25	≤ 27	> 32	Сомнительный**

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции.

** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата считать, что в образце обнаружена РНК патогенных лептоспир.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и экстракции РНК (см. табл. 5).

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроли	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (<i>C_t</i>) по каналу	
		FAM/Green	JOE/Yellow
ОК	Экстракция РНК	≤ 25	отсутствует
ПК	Экстракция РНК	≤ 25	≤ 26
К–	ОТ-ПЦР	отсутствует	отсутствует
К+	ОТ-ПЦР	–	≤ 25

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ОТ-ПЦР (К+) значение порогового цикла (*C_t*) по каналу JOE/Yellow отсутствует или превышает граничное значение, указанное в таблице 5. Необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена РНК патогенных видов лептоспир.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу JOE/Yellow и/или для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К–) на любом из каналов определено значение *C_t*. Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК, начиная с этапа экстракции РНК.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ5 и iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

А. Проведение ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор и блок питания оптической части прибора. Проводить измерения не менее, чем через 30 мин после включения оптической части прибора.

Открыть программу iCycler.

Задать схему планшета - расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала:

- Для прибора **iCycler iQ5** в окне ***Selected Plate Setup*** модуля ***Workshop*** нажать кнопку ***Create New*** или ***Edit***. Редактировать схему планшета в режиме ***Whole Plate loading***. В опции ***Select and load Fluorophores*** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM, JOE**. Задать объем реакции (***Sample Volume***): **25 мкл**, тип крышек (***Seal Type***): ***Domed Cap***, тип пробирок (***Vessel Type***): ***Tubes***. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку ***Save&Exit Plate Editing***.
- Для прибора **iCycler iQ** в окне ***Edit Plate Setup*** модуля ***Workshop***, в опции ***Samples: Whole Plate Loading*** задать схему расположения образцов в реакционном модуле и указать имя каждой пробы в окне ***Sample Identifier***. В опции ***Select and load Fluorophores*** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM, JOE**. Сохранить схему планшета, задав имя файла в окне ***Plate Setup Filename*** (с расширением **.pts**) и нажав кнопку ***Save this plate setup*** (в верхней части экрана). Можно редактировать уже использованную ранее схему планшета; для этого в окне ***Library*** открыть ***View Plate Setup***, выбрать нужный ***Plate Setup*** (файл с расширением **.pts**) и нажать кнопку ***Edit*** (справа). Отредактированный файл нужно также сохранить перед использованием. Назначить использование данной схемы планшета, нажав

кнопку **Run with selected protocol**.
Задать программу амплификации.

Таблица 6

Программа амплификации *Leptospira*

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	20 с	–	10
	65	50 с		
4	95	20 с	–	40
	61	50 с	FAM, JOE	
	65	20 с	–	

- Для прибора **iCycler iQ5** в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в блоке **Protocol** (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке *Users*).
- Для прибора **iCycler iQ** выбрать опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: **Cycle 3 – Step 2**. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** (*Leptospira.tmo*) и нажав кнопку **Save this protocol** (в верхней части экрана). При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в закладке **View Protocol** в модуле **Library**. Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **Run with selected plate setup**.

Поместить предварительно подготовленные для проведения ПЦР пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой.

Запустить выполнение выбранной программы **Leptospira** с заданной схемой планшета.

- Для прибора **iCycler iQ5** перед запуском выполнения программы следует проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Collect Well Factors from Experimental Plate**. Нажать кнопку **Begin Run**, дать название

эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.

- Для прибора **iCycler iQ** перед запуском выполнения программы в окне **Run Prep** следует проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Experimental Plate** в меню **Select well factor source**. Задать объем реакционной смеси в окне **Sample Volume** – 25 мкл. Для запуска нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.

После окончания программы приступить к анализу результатов.

Б. Анализ результатов

Анализ результатов по каналу JOE:

- Запустить программу и открыть файл с результатами эксперимента. Для этого:
 - Для прибора iCycler iQ5 выбрать нужный файл с данными анализа в окне **Data File** модуля **Workshop** и нажать кнопку **Analyze**.
 - Для прибора iCycler iQ в модуле **Library** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку **Analyze Data**.
 - Выбрать **Base line** в **Crossing Threshold User Defined** в диапазоне 20 – 25. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать кривые другой формы. В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога.
 - Вывести на экран таблицу результатов со значениями C_t , нажав кнопку **PCR Quant** (iCycler iQ) или кнопку **Results** (iCycler iQ5).

Анализ результатов по каналу FAM:

- Запустить программу и открыть файл с результатами эксперимента. Для этого:

- Для прибора iCycler iQ5 выбрать нужный файл с данными анализа в окне **Data File** модуля **Workshop** и нажать кнопку **Analyze**.
- Для прибора iCycler iQ в модуле **Library** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку **Analyze Data**.
- Выбрать **Base line** в **Crossing Threshold User Defined 25,0**.
- Вывести на экран таблицу результатов со значениями *Ct*, нажав кнопку **PCR Quant** (iCycler iQ) или кнопку **Results** (iCycler iQ5).

В. Интерпретация результатов

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) значения порогового цикла (*Ct*) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 7

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла (<i>Ct</i>) по каналу		Результат
FAM		
Осадки крови и бактериальных культур	Гомогенаты тканей и осадки мочи	JOE
≤ 27	≤ 29	отсутствует
определено или отсутствует		≤ 32
отсутствует или > 27	отсутствует или > 29	отсутствует или > 32
≤ 27	≤ 29	> 32

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции.

** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата считать, что в образце обнаружена РНК патогенных лептоспир.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и экстракции РНК (см. табл. 8).

Таблица 8

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроли	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (<i>Ct</i>) по каналу	
		FAM	JOE
ОК	Экстракция РНК	≤ 25	отсутствует
ПК	Экстракция РНК	≤ 25	≤ 27
К–	ОТ-ПЦР	отсутствует	отсутствует
К+	ОТ-ПЦР	-	≤ 26

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (*Ct*) по каналу JOE отсутствует или превышает граничное значение, указанное в таблице 8. Необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена РНК патогенных видов лептоспир.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу JOE и/или для отрицательного контроля ПЦР (К–) на любом из каналов определено значение *Ct*. Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая РНК, начиная с этапа экстракции РНК.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер по каталогу		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Код партии		Использовать до
	Дата изменения		Не допускать воздействия солнечного света
	Температурный диапазон		Дата изготовления
	Изготовитель		