Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Лабораторный совет Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Идентификация патогенных бактерий, выделенных при контроле пищевых продуктов, с применением системы BAX® System Q7

Методические рекомендации

№ 02.036-08

Издание официальное

Москва
2008

gost.e-ecolog.ru

Идентификация патогенных бактерий, выделенных при контроле пищевых продуктов, с применением системы BAX® System Q7: Методические рекомендации. – М.: Федеральное государственное учреждение здравоохранения «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2008. – 37 с.

Разработаны:

ГУ НИИ питания РАМН (Шевелева С.А., Ефимочкина Н.Р., Булахов А.В.); при частии ГОУ ВПО «Московский государственный университет прикладной биотехнологии» (Титов Е.И., Нефедова Н.Е., Ананьева Н.В.)

Рекомендованы к утверждению Лабораторным советом Роспотребнадзора протокол № 2 от 25.06.08).

Утверждены и введены в действие Председателем лабораторного совета, главным врачом ФГУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора А.И.Верещагиным 8.08.2008 г.

Введены впервые.

Содержание

1. Область применения	4
2. Сущность метода	4
3. Общие положения	6
4. Аппаратура, материалы и реактивы	7
5. Подготовка к анализу	9
5.1. Приготовление растворов и реактивов	9
5.2. Приготовление питательных сред	10
6. Выделение и накопление биомассы бактериальных культур, подвергаемых идентификации	12
7. Подготовка образцов чистых культур к анализу	15
8. Проведение лизиса и выделение ДНК	15
9. Подготовка к проведению ПЦР	16
10. Амплификация и детекция	17
11. Оценка результатов	27
12. Особенности проведения работ в ПЦР-лаборатории, контроль за контаминацией	34
13. Библиографические ссылки	36

УТВЕРЖДАЮ

Главный врач ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии»,

Председатель Лабораторного совета

Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

А.И.Верещагин

«18» августа 2008 г.

МР № 01.036.08

Идентификация патогенных бактерий, выделенных при контроле пищевых продуктов, с применением системы BAX® System Q7

Методические рекомендации

1. Область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации устанавливают метод идентификации бактерий, выделенных из пищевых продуктов и продовольственного сырья, и подозрительных на принадлежность к роду Salmonella, роду Campylobacter (в т.ч. видам C.jejuni, C.coli, C.lari), роду Listeria (в т.ч. виду Listeria monocytogenes), серотипу E.coli O157:H7, на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

1.2. Методические рекомендации предназначены для применения в испытательных лабораториях, аккредитованных в установленном порядке на право проведения исследований пищевых продуктов и продовольственного сырья.

2. Сущность метода

2.1. Метод основан на обнаружении специфических целевых нуклеотидных последовательностей ДНК, присутствующих в микроорганизмах-мишенях, с помощью комплементарных данным последовательностям зондов, меченых флуо-

ресцентным красителем, посредством полимеразной цепной реакции в реалы времени

В качестве зондов используются олигонуклеотиды, содержащие на 5'-ко флуорофор–донор флуоресцентного излучения (репортер), а на 3'-конце - его центор (гаситель). При гибридизации с амплифицируемой последовательность ходе ПЦР зонд разрушается за счет 5'-экзонуклеазной активности Т полимеразы, за счет чего происходит разобщение флуорофора и гасителя. Фл ресцентный сигнал репортера вследствие этого усиливается пропорционал числу накапливаемых ампликонов.

По завершении амплификации, температура реакционной смеси повыша ся до значения, при котором амплифицированные цепи ДНК денатурируют краситель высвобождается, и интенсивность флуоресценции снижается. Эти менения флуоресценции в рамках созданного пользователем протокола регист руются (фиксируются) на графике зависимости от температуры в виде крив (кривая накопления продуктов ПЦР или кривая плавления), которая автомати ски интерпретируется программным обеспечением системы прибора. Сравнен интенсивности регистрируемого флуоресцентного сигнала в температурных ди пазонах расположения пиков на кривой контрольных препаратов и исследуемс образца бактериальной культуры позволяет в реальном времени качественно с ределить присутствие в нем матричной ДНК микроорганизмов-мишеней. Оконч тельные результаты отражаются в виде символов разного цвета на специальн панели.

2.2. В качестве положительных контролей используется стандартные прег раты ДНК микроорганизмов-мишеней родов Salmonella, Campylobacter (в т.ч. в дов C.jejuni, C.coli, C.lari), Listeria (в т.ч. вида Listeria monocytogenes), Escherich coli серотипа O157:H7.

2.3. Измерение флуоресценции производится используемым прибором д. амплификации автоматически с помощью специфичных к красителям свет фильтров в оптической системе прибора. Регистрация результатов методом ПЦР реальном времени исключает необходимость открывания пробирки после оконч

ния амплификации, что значительно снижает вероятность возникновения контаминации.

3. Общие положения

3.1. Представленный в Методических рекомендациях метод может применяться:

а) для целей ускоренного подтверждения принадлежности выделенных микробиологическими методами культур к бактериям родов Salmonella, Campylobacter (в т.ч. видов C.jejuni, C.coli, C.lari), Listeria (в т.ч. вида Listeria monocytogenes), Escherichia coli серотипа O157:H7 в качестве дополнительных к биохимическим и серологическим методам идентификации, в том числе:

- при затруднениях идентификации бактерий рода Salmonella - взамен расширенного набора биохимических тестов в случаях отсутствия агглютинации культуры с поливалентной диагностической сальмонеллезной 0-агглютинирующей сывороткой (A, B, C, D, E) и со смесью 0-сывороток редких групп при положительном результате стандартного набора биохимических тестов; при предположительном результате в случае наличия агглютинации с сыворотками редких групп; при положительных результатах серологического исследования и нетипичных результатах биохимических тестов (отклонения по 2 и более признакам);

- при идентификации Escherichia coli серотипа O157:H7 - взамен расширенного набора биохимических тестов одновременно с подтверждением серологической принадлежности к серогруппе 0157;

- при идентификации Listeria monocytogenes - взамен расширенного набора биохимических тестов одновременно с определением наличия лецитиназной и β-гемолитической активности.

б) для одновременного определения принадлежности микроорганизмов, выделенных из пищевых продуктов и продовольственного сырья, к родам Salmonella, Campylobacter (в т.ч. видам C.jejuni, C.coli, C.lari), Listeria (в т.ч. виду Listeria monocytogenes), Escherichia coli серотипа O157:H7.

3.2. Метод рекомендуется к применению при осуществлении
качества и безопасности пищевых продуктов и продовольственно
сырья, в том числе Методы не могут применя
ся при проведении противоэпидемических мероприятий и эпидемиологическ
расследований.

4. Аппаратура, материалы, реактивы

4.1. Для идентификации бактериальных культур, выделенных из пищев
продуктов и продовольственного сырья, методом ПЦР в реальном времени
пользуют следующие инструменты и аппаратуру:

1) амплификатор с оптической приставкой (типа циклера/детектора Q7 систе
BAX®) или другие приборы аналогичного назначения с равноценными техни
скими характеристиками, допущенные к применению в Российской Федерации;

2) компьютер, совместимый с программным обеспечением амплификатора с
тической приставкой, в комплекте с монитором, клавиатурой, мышью, кабел
компакт-дисками с информацией по эксплуатации и инструкциями по настрой
прибора;

3) подогреватель;

4) вставки в подогреватели для пробирок;

5) термометр;

6) таймер;

7) блоки охлаждающие для ПЦР-пробирок – 2 шт.;

8) охлаждающий штатив для пробирок;

9) инструменты для надевания/снятия крышек с ПЦР-пробирок, поставляемые
комплекте (открыватель пробирок);

10) держатель для ПЦР-пробирок;

11) держатель для охлаждающего блока;

12) термостат типа «ТЕРМО 24-15» под пробирки типа Эппендорф вместим
стью 1,5 мл, диапазон температур от 15°С до 120°С – 2 шт.;

13) холодильник бытовой электрический ГОСТ 26678;

14) облучатель бактерицидный настенный ОБН-150 ТУ 16-535;

15) дозаторы автоматические одноканальные переменного объема:

- 5-50 мкл с шагом 0,5 мкл, с точностью 3,0±0,6%;
- 20-200 мкл с шагом 1,0 мкл, с точностью 3,0±0,6%;
- 100-1000 мкл с шагом 5,0 мкл, с точностью 1,5±0,5%;

16) пробирки микроцентрифужные типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл;

17) пробирки для ПЦР со съемными крышками;

18) плоские крышки для ПЦР-пробирок;

19) штативы «рабочее место» для пробирок микроцентрифужных типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл;

20) наконечники с фильтром (насадки) для дозаторов с переменным объемом дозирования до 50; 100; 200; 1000 мкл в штативе,

21) контейнер для сброса наконечников;

22) анаэробный инкубатор;

23) настольная система для анаэробного инкубирования;

24) пакеты газогенераторные для микроаэрофильного инкубирования.

Допускается использование другой аппаратуры и инструментария аналогичного назначения, разрешенных к применению в установленном порядке, с характеристиками, обеспечивающими проведение исследований в соответствии с настоящими Методическими рекомендациями.

4.2. Для идентификации бактериальных культур, выделенных из пищевых продуктов и продовольственного сырья, методом ПЦР в реальном времени используют следующие материалы и реактивы:

1) питательные среды для наращивания биомассы идентифицируемых культур и приготовления бактериальных взвесей и их компоненты:

- мясопептонный агар,
- триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом,
- триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом,
- кровяной Колумбийский агар,
- бульон для бруцелл,

агар Клиглера,

- агар Олькеницкого,
- агар Рессслля,
- кровь баранья дефибринированная стерильная;
- основа колумбийского кровяного агара.

2) комплект реагентов (набор на 96 тестов) для выделения ДНК из биома идентифицируемых культур, содержащий:

- лизирующий буфер,
- фермент протеазу.

3) комплект реагентов (набор на 96 тестов) для проведения амплификации, держащий:

- таблетированную смесь олигонуклеотидных праймеров и нуклеозидтрифос тов, полимеразу в ПЦР-пробирках;
- положительный контроль с клонированным специфическим фрагментом Д соответствующих микроорганизмов-мишеней;

4) оптически прозрачные крышки для ПЦР-пробирок;

5) спирт этиловый ректификованный ГОСТ Р 51652-00;

6) вода дистиллированная ГОСТ 6709-72;

7) перчатки резиновые или латексные неопудренные.

Упаковки с реагентами должны храниться в холодильнике при температ (4±2)°С. Замораживание не допускается. Реагенты должны быть использованы истечения срока их хранения, указанного на отдельных для каждого реагента э кетках. После того, как протеаза добавлена к лизирующему буферу, получени готовый раствор должен храниться при температуре (4±2)°С, не более двух дель.

5. Подготовка к анализу

5.1. Приготовление растворов и реактивов

5.1.1. Изотонический (0,85 %-ный водный) раствор хлорида натрия готовят в ответствии с ГОСТ 26669-85.

5.1.2. Растворы и реактивы для окраски микроскопических препаратов по Гра готовят по ГОСТ 10444.1 или в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя

5.1.2. Стерильный фосфатный буфер (pH 7,2 ± 0,1) готовят в соответствии с нижеследующей прописью:

Ингредиенты	Количество
KH_2PO_4	0,45 г
Na_2HPO_4	5,34 г
Дистиллированная вода	1000 $см^3$

Стерилизовать при температуре 121°С в течение 30 мин.

5.2. Приготовление питательных сред

5.2.1. Среды промышленного изготовления, поименованные в п. 4.2., готовят согласно прописям на этикетке или в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя.

5.2.2. Питательный агар с 1 % глюкозы и питательный бульон с 1 % глюкозы (МПА с 1 % глюкозы, МПБ с 1 % глюкозы) готовят в соответствии с ГОСТ 10444.1-84 «Консервы. Приготовление растворов, красок, индикаторов, питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе».

5.2.3. Триптон-соевый бульон с дрожжевым экстрактом, триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом.

Состав сред (г/л): ферментативный гидролизат казеина - 17,0; пептон соевый -3,0; натрий хлористый - 5,0; фосфат калия однозамещенный - 2,5; глюкоза - 2,5; дрожжевой экстракт - 6,0; агар микробиологический (для TSYEA) - 15,0.

Компоненты растворяют в 1000 $см^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают, устанавливают pH 7,3 ± 0,2 и автоклавируют при 121°С в течение 15 мин. Готовые среды разливают в стерильные колбы или пробирки и хранят в защищенных от света условиях при температуре не выше 8°С.

5.2.4. Бульон для бруцелл (неселективный):

Состав основы среды:

Ингредиенты	Количество, г/л
Гидролизат казеина	10,0
Пептический перевар животной ткани	10,0
Дрожжевой экстракт	2,0
Глюкоза	1,0
Натрия хлорид	5,0
Натрия бисульфит	0,1

Используют готовую основу среды промышленного изготовления указанн го состава. Приготовление осуществляют согласно прописи на этикетке. Раств рить порошок сухой основы в дистиллированной воде. При необходимости п догреть до кипения для полного растворения частиц. Стерилизовать автоклавир ванием при температуре 121°С в течение 15 минут. Разлить по пробиркам из ра чета 10 мл на 1 пробирку. pH среды после автоклавирования (при 25°С) 7,0 ± 0,2

5.2.5. Колумбийский кровяной агар (неселективный).

Состав основы среды:

Ингредиенты	Количество, г/л
Пептон (специальный)	23,0
Крахмал кукурузный	1,0
Натрия хлорид	5,0
Агар-агар	15,0

Используют готовую основу среды промышленного изготовления указанн го состава. Приготовление осуществляют согласно прописи на этикетке. Раств рить порошкообразную сухую основу в дистиллированной воде. Подогреть , кипения для полного растворения частиц. Стерилизовать автоклавированием п температуре 121°С в течение 15 минут. Остудить до 40-50°С и асептически вн сти 70 мл стерильной дефибринированной крови барана, тщательно перемешать разлить в стерильные чашки Петри слоем 4-5 мл. pH среды после автоклавирован (при 25°С) 7,3 ± 0,2.

5.2.6. Трехсахарный железосодержащий агар.

Допускается использование двух модификаций среды: ТСА и среды №13.

Состав сред:

Ингредиенты	Количество, г/л	
	Среда №13	Среда ТСА
Пептический перевар животной ткани	10,0	20,0
Гидролизат казеина	10,0	–
Дрожжевой экстракт	3,0	3,0
Мясной экстракт	3,0	3,0
Лактоза	10,0	10,0
Сахароза	10,0	10,0
Глюкоза	1,0	1,0
Натрия хлорид	5,0	5,0
Железа сульфат	0,2	–
Железа (III) цитрат	–	0,3

Натрия тиосульфат	0,3	–
Натрия тиосульфат (х $5H_2O$)	–	0,3
Феноловый красный	0,024	0,024
Агар-агар	12,0	12,0

Используют готовые основы сред промышленного изготовления с указанным составом.

Приготовление осуществляют согласно прописям на этикетках. Растворить порошкообразную сухую основу в дистиллированной воде. Подогреть до кипения для полного растворения частиц. Тщательно перемешать и разлить в пробирки для тестирования. Стерилизовать автоклавированием при температуре 121°С в течение 15 минут. Остудить среду в наклонном положении при комнатной температуре для формирования скоса и столбика высотой 2,5 см. pH среды после автоклавирования (при 25°С) 7,4 ± 0,2.

6. Выделение и накопление биомассы бактериальных культур, подвергаемых идентификации

6.1. ***Первичный посев для выявления*** бактерий рода Salmonella в пищевых продуктах проводят согласно утвержденным в установленном порядке методам исследования пищевых продуктов [1-9]. Для определения принадлежности полученных характерных колоний к бактериям рода Salmonella отбирают отдельные колонии, выращенные на агаризованных селективно-диагностических средах, которые отвечают следующим требованиям: на висмут-сульфит агаре колонии черные с характерным металлическим блеском, а также зеленоватые с темно-зеленым ободком и с пигментацией среды под колониями; на среде Плоскирева – колонии бесцветные, прозрачные, более плотные, чем на среде Эндо; на среде Эндо колонии круглые бесцветные или слегка розоватые, прозрачные; на среде Левина колонии прозрачные, слабо-розовые или розовато-фиолетовые. При микроскопировании мазков бактерии рода Salmonella представляют собой мелкие, прямые бесспоровые палочки с закругленными концами, грамотрицательные.

Для получения чистых культур отбирают не менее 3-х типичных или подозрительных на принадлежность к роду Salmonella изолированных колоний, производят посев штрихом на поверхность плотных питательных сред МПА, или

триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом в отдельных чашках Петри, и пробирки с жидкими средами (триптон-соевый бульон с дрожжевым экстракто инкубируют в течение 24 часов при 37±1 °С.

6.2. ***Первичный посев для выявления*** бактерий рода Listeria, в том ч Listeria monocytogenes, в пищевых продуктах проводят согласно утвержденн установленном порядке методам исследования [10,11].

Для определения принадлежности полученных характерных колоний к teria monocytogenes отбирают отдельные колонии, выращенные на агаризова селективно-диагностических средах, которые отвечают следующим требова на ПАЛКАМ-агаре через 24 часа инкубирования листерии формируют мелки ровато-зеленые или оливково-зеленые колонии с черным ореолом, диаметром мм, иногда с черным центром. Через 48 часов колонии имеют диаметр 1,0-2,0 приобретают зеленую окраску с углубленными центрами, окруженными че ореолом. На селективном Оксфорд-агаре листерии, выращенные в течение образуют мелкие (1 мм), сероватые, с черным ореолом колонии, через 48 ч ф руют более темные, около 2 мм в диаметре колонии с черным ореолом и угл нием в центре. При микроскопировании мазков бактерии рода Listeria и Li monocytogenes представляют собой грамположительные неспорообразующи роткие палочки с закругленными концами, иногда почти кокки, одиночные коротких цепочках, реже в длинных нитях.

Для получения чистых культур отбирают не менее 3-х характерных для терий колоний и производят посев штрихом на поверхность плотных питател сред МПА, или триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом в отдельных ча Петри или в пробирки с жидкими средами (триптон-соевый бульон с дрожж экстрактом) и инкубируют в течение 24 часов при 37±1 °С.

6.3. ***Первичный посев для выявления*** бактерий рода Campylobacter в п вых продуктах проводят согласно утвержденным в установленном порядке дам исследования [12]. Для определения принадлежности полученных хара ных колоний к бактериям рода Campylobacter отбирают отдельные колонии ращенные на агаризованных селективно-диагностических средах, которые

чают следующим требованиям: при росте в микроаэрофильных условиях на поверхности агара Престон, селективного угольного агара, кампилобак-агара образуют мелкие округлые колонии или колонии средних размеров, неправильной формы, как бы растекающиеся по ходу штриха, серые или полупрозрачные с сероватым оттенком, гладкие, влажные, блестящие. При микроскопировании мазков бактерии рода Campylobacter - грамотрицательные мелкие, тонкие палочки с одним или более завитками; имеют вид запятой, буквы S, либо палочки при соединении двух клеток. В стареющих культурах (через 48-72 часов инкубации на твердой среде) могут обнаруживаться кокковидные клетки.

Для получения чистых культур отбирают не менее 3-х типичных или подозрительных на принадлежность к роду Campylobacter изолированных колоний, производят посев на поверхность кровяного Колумбийского агара или в бульон для бруцелл и инкубируют при 42±1 °С в течение 24-48 часов в микроаэрофильной атмосфере.

6.4. ***Первичный посев для выявления*** бактерий E.coli, в том числе серотипа O157:H7 в пищевых продуктах проводят согласно [3, 13-15]. Для определения принадлежности характерных колоний, выращенных на агаризованных селективно-диагностических средах, к бактериям E.coli O157:H7 отбирают отдельные колонии, которые отвечают следующим требованиям: при росте на поверхности Сорбитол-агара, E.coli O157:H7-агара – колонии средней величины, выпуклые, круглые, влажные, прозрачные, бесцветные (не ферментирующие сорбит). Могут быть бледно-розовыми со светлым ореолом, мутноватыми. На среде Эндо – колонии средней величины, выпуклые, круглые, влажные, темно-красные, лактозоположительные. При микроскопировании мазков бактерии E.coli, в том числе серотипа O157:H7 представляют собой грамотрицательные различной величины бесспоровые палочки.

Для получения чистых культур отбирают не менее 3-х сорбитолотрицательных колоний, типичных или подозрительных на принадлежность к серотипу O157:H7 E.coli, изолированных колоний (или лактозоположительных колоний со среды Эндо) и пересевают на поверхность агаров Клиглера, Олькениц-

кого, Рассела в пробирках или в триптон-соевый бульон с дрожжевым экстракт Посевы инкубируют в термостате при 37°С 18-24 часа.

7. Подготовка образцов чистых культур к анализу

Чистые культуры, полученные по п.п. 6.1.-6.4. на плотных питательных с дах, смывают с поверхности агара стерильным физиологическим раствором и реносят взвесь в стандартную пробирку. Концентрация клеток в суспензии дол на быть не менее $5 \cdot 10^6$ клеток/мл, при расчете с использованием оптическ стандарта мутности на 5 или 10 единиц.

Приготовленные указанным образом взвеси микроорганизмов или бульо ные культуры, полученные по п.п.6.1.-6.4. и содержащие не менее $5 \cdot 10^6$ кл ток/мл, подвергают дальнейшим манипуляциям для выделения ДНК. Подгото ленные образцы используют для анализа в тот же день.

8. Проведение лизиса и выделение ДНК

Выделение ДНК из образцов исследуемых бактериальных культур пров дят с использованием комплекта реагентов, входящих в тест-наборы систем BAX® Q7 для обнаружения патогенов путем ПЦР в реальном времени. Процеду включает следующие этапы:

8.1. Приготовление лизирующего реагента: добавляют 150 мкл протеазы к флакон с 12 мл лизирующего буфера, наносят на флакон маркировку с датой пр готовления (лизирующий реагент хранится в плотно закрытом флаконе не боль двух недель при температуре 2-8°С). Допускается готовить меньший объем лиз рующего реагента из расчета 12,5 мкл протеазы на 1 мл лизирующего буфера зависимости от потребности.

8.2. Внесение лизирующего реагента в каждую из пробирок всей группы: заранее промаркированные пробирки для одной идентифицируемой группы ми роорганизмов (в том числе для отрицательного и положительного контролей) до бавляют по 200 мкл лизирующего реагента.

8.3. Смешивание реагента и суспензий исследуемых культур: вносят по мкл образцов в каждую из подготовленных пробирок всей группы, при этом ис пользуют чистые наконечники для каждого образца, включая отрицательный кон

троль. В качестве отрицательного контроля используют жидкие питательные среды для наращивания биомассы культуры, подвергаемой идентификации, или физиологический раствор.

8.4. Нагревание смеси: помещают штатив с группой пробирок в предварительно нагретый термостат и выдерживают пробирки при следующих режимах:

- 20 мин при 37±2 °С, затем 10 мин при 95±3 °С – для бактерий родов Campylobacter, Salmonella и серотипа E.coli O157:H7;
- 60 мин при 55±2 °С, затем 10 мин при 95±3 °С – для бактерий рода Listeria и Listeria monocytogenes.

8.5. Охлаждение лизата: вынимают штативы с пробирками из термостата, устанавливают их в охлаждающий блок и выдерживают в течение 5 мин до достижения температуры 2-8°С. Продолжительность всей операции по охлаждению не должна превышать 30 минут, включая подготовку охлаждающего блока (извлечение блока из холодильника и установку в него пробирок).

9. Подготовка к проведению ПЦР

ПЦР-идентификация исследуемых бактериальных культур проводится с использованием таблетированных реагентов, входящих в комплект тест-набора системы BAX® Q7. Процедура подготовки включает следующие этапы:

9.1. Перед началом работы устанавливают охлажденную до 2-8°С вставку для ПЦР-пробирок в охлаждающий блок. Помещают панель для ПЦР-пробирок поверх вставки. Размещают необходимое количество стрипованных ПЦР-пробирок с таблетированными смесями ПЦР-реагентов, предназначенных для идентификации соответствующего вида микроорганизмов, в держателе из расчета по одной пробирке на каждый образец.

9.2. Растворение ПЦР-таблеток в лизате: с помощью инструмента для надевания/снятия крышек приоткрывают крышки на пробирках, удаляют их и вносят лизаты культур и контроли в количестве 50 мкл при идентификации бактерий рода Salmonella, рода Listeria, Listeria monocytogenes, E.coli O157:H7 или 30 мкл при идентификации бактерий рода Campylobacter.

9.3. Тщательно закрывают пробирки новыми оптически прозрач. крышками, не допуская неплотностей: плохо закрытые крышки могут приве нарушению реакции или получению неправильных результатов. Содерж пробирок осторожно перемешивают встряхиванием охлаждающего блока для творения ПЦР-таблеток в лизате.

10. Амплификация и детекция

Амплификацию в системе BAX® Q7 проводят по программе, объединяя стадии отжига и элонгации в один этап

Реакцию проводят в реакционной смеси объемом 50 мкл, включающей бя реакционный буфер, адаптированный к используемому типу полимер смесь нуклеозидтрифосфатов; флуоресцентно-меченые зонды-праймеры; полимеразу.

Амплификацию проводят по программе:

1) 1 цикл - 10 мин – 95^{0}C;

2) 50 циклов: 20 с – 95^{0}C, 1 мин – 65^{0}C.

Постановка ПЦР в реальном времени сопровождается созданием в исп зуемом приборе для амплификации специального протокола. Используемое ройство системы BAX® Q7 позволяет создавать и выполнять различные прот лы термоциклирования с одновременным сбором и анализом данных флус ценции от оптического блока (для разных культур).

10.1. Создание протокола (файла) исследования

10.1.1) Запускают приложение к системе BAX® иконкой на рабочем с персонального компьютера. На экране появится окно с изображением пустой зорной панели, разделенной на две части: сетка с 96 пустыми ячейками и поле ввода данных (рис.1).

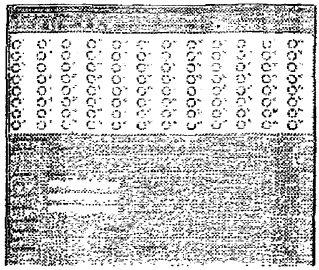


Рис.1. Обзорная панель

10.1.2) Для создания файла, содержащего всю информацию об идентифицируемых образцах, выбирают ФАЙЛ (FILE) > МАСТЕР ЗАПУСКА (RACK WIZARD) в строке меню. Для следования запросам мастера ПЦР, нажимают ДАЛЕЕ (NEXT) или переходят к вводу информации вручную, нажимая ОТМЕНА (CANCEL).

10.1.2.1.Создание файла с помощью мастера ПЦР

1) 1 ступень - выбирают необходимый тип файла: новый («New») или основанный на предыдущем запуске («Based on a previous rack»). Нажимают ДАЛЕЕ (NEXT) для продолжения.

2) 2 ступень - вводят ИМЯ ФАЙЛА («File Name»), МЕТКУ («Label»), ДАННЫЕ ОБ ОПЕРАТОРЕ («Operator ID») и ОПИСАНИЕ («Description») (имя файла по дате анализа вводится автоматически, при необходимости его можно изменить). Нажимают ДАЛЕЕ (NEXT) для продолжения.

3) 3 ступень - выбирают вариант переопределения уже имеющейся информации:

- НЕ МЕНЯТЬ ТЕКУЩУЮ ИНФОРМАЦИЮ («DON'T CHANGE ANY INFORMATION»)
- ПЕРЕОПРЕДЕЛИТЬ ВЫБРАННЫЕ ЯЧЕЙКИ («REDEFINE SELECTED WELLS»)
- ПЕРЕОПРЕДЕЛИТЬ ВСЕ 96 ЯЧЕЕК («REDEFINE ALL 96 WELLS»)

Ячейки можно выбрать, кликнув по строке, колонке или отдельной ячейке.

4) Под надписью «ИНФОРМАЦИЯ О ЯЧЕЙКАХ» («WE INFORMATION») выбирают МИШЕНЬ («TARGET») из выпадающего ме Другие поля служат для ввода НОМЕРА ПАРТИИ (СЕРИИ) («KIT L NUMBER»), СВЕДЕНИЙ ОБ ОБРАЗЦЕ («SAMPLE ID») и ОПИСАН («DESCRIPTION»), которые указываются при необходимости. После оконча ввода необходимых данных нажимают APPLY. Когда информация обо всех разцах будет введена, нажимают ДАЛЕЕ (NEXT) для продолжения.

5) Если создан новый файл панели, в итоговом окне информация бу представлена подробно. Если импортирован предыдущий файл панели, инфор ция будет представлена в сокращенном виде (рис.2).

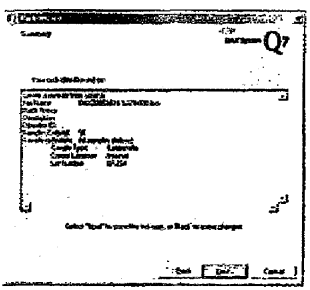


Рис.2. Вид итогового окна

6) После просмотра информации в итоговом окне нажимают ДАЛ (NEXT) для продолжения, при этом завершающее окно сообщит, что ввод инф мации о панели закончен. Нажимают «Завершение» (FINISH) для создания фай панели. После того как файл панели создан, содержащуюся в нем информац можно менять, редактируя определения отдельных ячеек.

10.1.2.2. Создание файла панели вручную

1) На пустой обзорной панели, выбирают команду FILE > SAVE AS строке меню для создания нового файла панели с расширением «.bax».

2) Вводят информацию о панели в нижнюю часть окна:

- Вводят метку для панели («Label») (необязательно). Для перехода на сл дующее поле нажимают клавишу TAB.
- Вводят сведения об операторе («Operator ID») (необязательно).

- Вводят описание панели («Description») (необязательно)

3) Нажимают APPLY.

После того, как файл панели будет создан, можно редактировать содержащуюся в нем информацию. Однако сам файл не будет изменен, пока не выбрана команда FILE >SAVE в строке меню.

4) Включают обзор ячейки, кликнув по этой ячейке в верхней части окна.

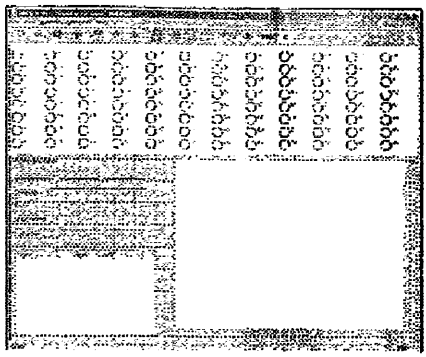


Рис. 3. Обзор данных ячейки

Обзор ячейки можно включить командой VIEW > EDIT WELL INFO в строке меню или кликнув по соответствующему значку на панели инструментов. Можно вернуться к обзору панели командой VIEW > EDIT RACK INFO в строке меню или кликнув по соответствующему значку на панели инструментов.

5) Вводят информацию об образце:

- Если автоматическая нумерация ячеек не используется, кликнув по первой ячейке, вводят сведения об образце («Sample ID»). Нажимают клавишу ENTER для перемещения в следующую ячейку и вводят сведения об образце.
- Выбирают все ячейки с одним и тем же целевым организмом.

Допускается вводить данные о группе ячеек, кликнув по строке или столбцу ячеек. Любые данные, которые будут введены в обзор ячейки, относятся ко всем выделенным ячейкам.

- Выбирают требуемую мишень – целевой организм («Target») из выпадающего меню.

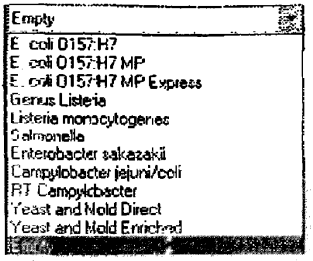


Рис.4 Выбор группы микроорганизмов – мишени

Способ управления ячейками («Control») будет введен автоматически.

Определение бактерий рода Campylobacter (C.jejuni, C.coli and C.lari проводится одновременно с другими мишенями. Если сделать такой выбор, светится соответствующее сообщение об ошибке.



Рис.5. Сообщение об ошибке

- Вводят номер серии набора («Kit Lot Number»).
- В поле описание («Description») может быть введена какая-либо дополнит ная информация (при необходимости).

Клавишей TAB можно перейти к следующей ячейке, если на любом из гов нажать клавишу ENTER, можно перейти в следующее поле обзора ячейки.

6) Нажать APPLY для продолжения. В верхней части окна отображения нели синими кружками обозначаются занятые образцами ячейки. Выбирают F > SAVE («Файл» < «Сохранить») в строке меню для сохранения созданного с ла.

10.2. Подготовка прибора к работе

10.2.1. Для нагрева прибора до требуемой температуры необходимо пр водить его включение заранее до запуска непосредственно процесса амплиф ции, а именно перед началом процедуры лизиса образцов. Это позволяет прои сти запуск анализа немедленно после загрузки охлажденных образцов, как то: в них растворятся ПЦР-таблетки

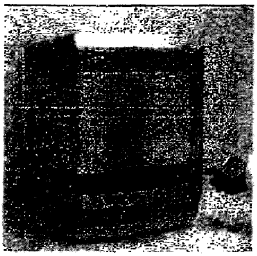


Рис. 6. Включение прибора

10.2.2. В разделе OPERATION строки меню, выбирают команду RUN FULL PROCESS, активизирующую мастера запуска ПЦР и детекции («PCR and Detection Wizard»), что позволяет начать процесс идентификации.

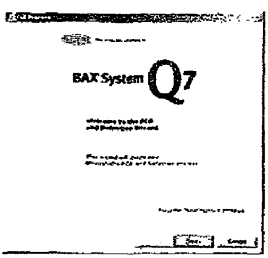


Рис. 7. Включение процесса амплификации

Примечание: Запустить процесс анализа можно, кликнув на соответствующем значке панели инструментов

Если файл с обзором панели не был сохранен, соответствующее окно укажет на это и предложит сохранить его (с расширением «.bax») до начала процесса. Допускается вводить команду детектировать только часть из амплифицированных образцов, выбрав команду OPERATION >DETECTION ONLY в строке меню или кликнув на соответствующем значке панели инструментов

10.2.3. Появится новое окно, сообщающее о том, что производится предварительный нагрев прибора и предупреждение о том, чтобы Вы не загружали в него образцы.

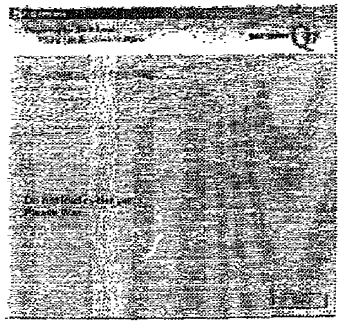


Рис. 8. Предупреждение о процессе нагрева прибора

Когда требуемая температура будет достигнута, мастер предложит нуть NEXT для продолжения.

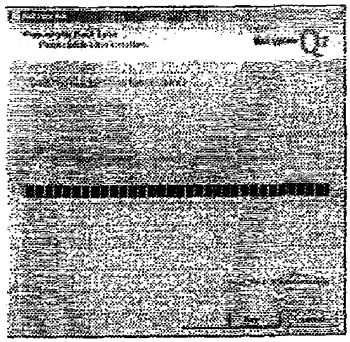


Рис.9. Завершение процесса нагрева

10.3. Загрузка образцов и запуск анализа

10.3.1. Когда необходимая температура будет достигнута, на экране в тится окно «Готовность к загрузке» («Ready for Rack Load»), предлагающее з зить образцы, для чего:

10.3.2. Открывают ящик нажатием на ямку с правой стороны.

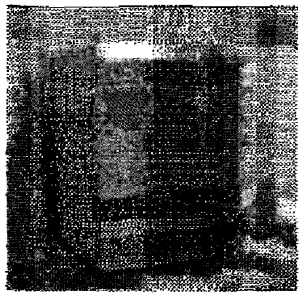


Рис. 10. Открытие блока амплификатора

10.3.3. Извлекают вставку с ПЦР-пробирками из охлаждающего блока и устанавливают в соответствии с файлом панели в блок амплификатора системы BAX® Q7 при этом работу с охлаждающим блоком необходимо закончить не позже, чем за 30 мин после его извлечения из холодильника. Образцы должны оставаться холодными до момента загрузки в прибор. Пробирки с оставшимся лизатом сохраняют при 2-8 °С до получения результатов анализа, после чего утилизируют автоклавированием.

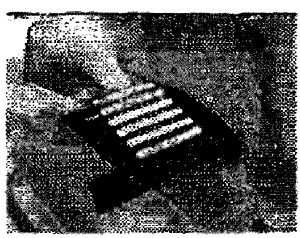


Рис.11. Установка ПЦР-пробирок в блок амплификатора

10.3.4. Закрывают ящик мягким нажатием на ямку с правой стороны.

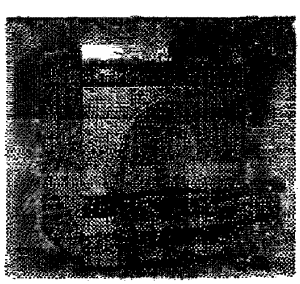


Рис.12. Закрытие блока амплификатора

10.3.5. Нажимают NEXT для начала процесса идентификации микроорганизмов

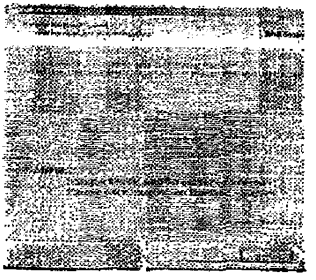


Рис.13. Начало процесса амплификации

Предупреждение: Нагревательный блок ящика ГОРЯЧИЙ. Не прикаса к его горячей поверхности.

10.3.6. В ходе амплификации на экране высвечивается окно «Сост процесса ПЦР» («PCR Cycling Status»), отображающее состояние процесса.

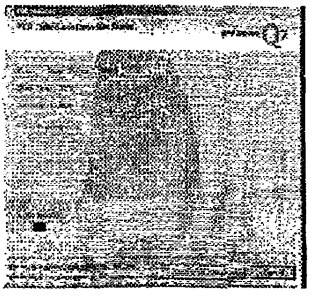


Рис. 14. Отображение состояние процесса амплификации

10.3.7. В процессе детекции на экране отражается окно «Состояние д ции» («Detection Status»). Когда этот этап закончится (When this phase is fini прибор автоматически отключит нагревание блока. Если используется воз ность автоматического экспорта данных, файл с ними будет немедленно сохр в указанной папке.

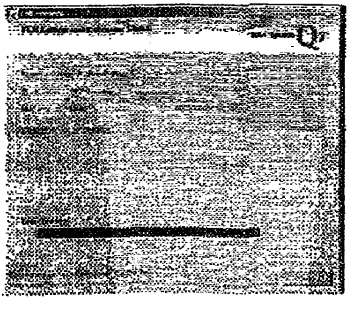


Рис. 15. Завершение процесса идентификации

Примечание: Это сообщение не отображается, когда запущена ПЦР в режиме реального времени (определение бактерий рода Campylobacter), т.к. детекция в этом случае производится одновременно с амплификацией.

10.3.8. По окончании процесса детекции на экране высветится окно «Выгрузка», предлагающая извлечь из прибора образцы. Для этого открывают ящик нажатием на ямку с правой стороны прибора и аккуратно удаляют держатель с ПЦР-пробирками. Помещают образцы в пакет и хранят в холодильнике, пока не будет закончено рассмотрение результатов, затем пробирки утилизируют в соответствии с МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».

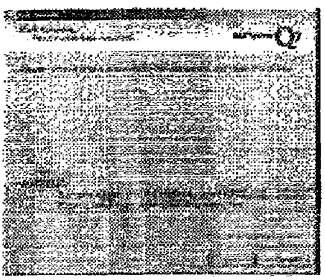


Рис. 16. Сообщение о возможности открыть амплификатор и извлечь образцы

10.3.9. На экране высветится окно «Нормальное окончание процесса» («Process Completed Normally»). Нажимают «FINISH» для просмотра результатов, полученных для исследуемых образцов.

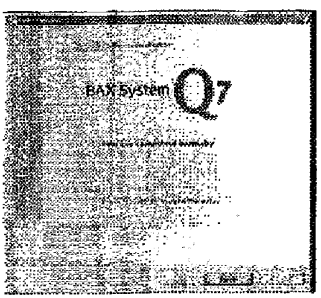


Рис. 17. Переход в режим просмотра результатов

Программа всего процесса, включая амплификацию и детекцию, требуе около трех с половиной часов. Для исследования методом ПЦР в режиме реальн го времени (определение бактерий рода Campylobacter), когда детекция сопряж на с амплификацией, длительность процесса составляет не более 90 мин.

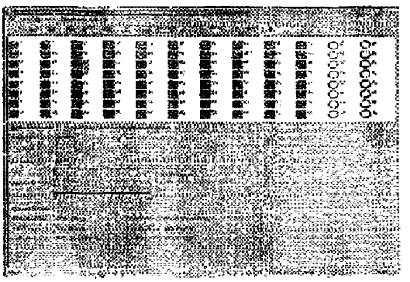
11. Оценка результатов

11.1. Результаты идентификации патогенных микроорганизмов отражаютс на экране компьютера в сохраненном файле в виде панели, содержащей ячейк окрашенные разными цветами с определенным символом, значения которых ин терпретируются в соответствии с таблицей.

Оценка результатов анализа

Значки	Цвет	Результат
	Зеленый (-)	Отрицательный для организма-мишени
	Красный (+)	Положительный для организма мишени
	Желтый (?)	Неопределенный результат
	Желтый (?), перечеркнутый красным	Сообщение об ошибке

11.2. Результаты анализа по каждой исследуемой пробе проверяют такж путем выбора и просмотра данных в соответствующих отдельных ячейках (ил группах ячеек). Полученные результаты можно видеть на сером поле окна пре ставления результатов или в списке.



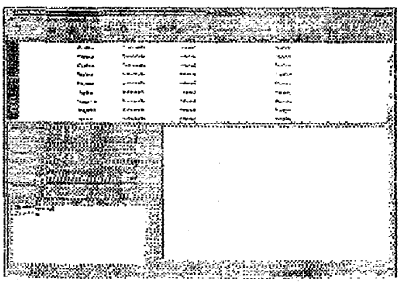


Рис. 18. Просмотр результатов анализа

На листе с результатами в нижней части окна содержатся данные о целевы организмах и положительном контроле.

11.3. Дополнительно оценку результатов анализа проводят с учетом характера кривых плавления, которые отражаются на графике в правой части окна, и характеризуют зависимость интенсивности флуоресценции от температуры. Графики кривых плавления содержат целевые пики и контрольные пики.

Целевые пики – пики на кривой плавления в соответствующих температурных рамках при положительной реакции. Пики не должны выходить за пределы установленных рамок, но при сильно положительных реакциях пик может немного смещаться к пределу с более низкой температурой, при слабо положительных реакциях – к пределу с более высокой температурой.

Контрольные пики – пики, находящиеся в рамках от 78 до 80°С и различающиеся по высоте в зависимости от количества мишени. При очень большом количестве клеток мишени контрольные пики могут быть очень маленькими или отсутствовать.

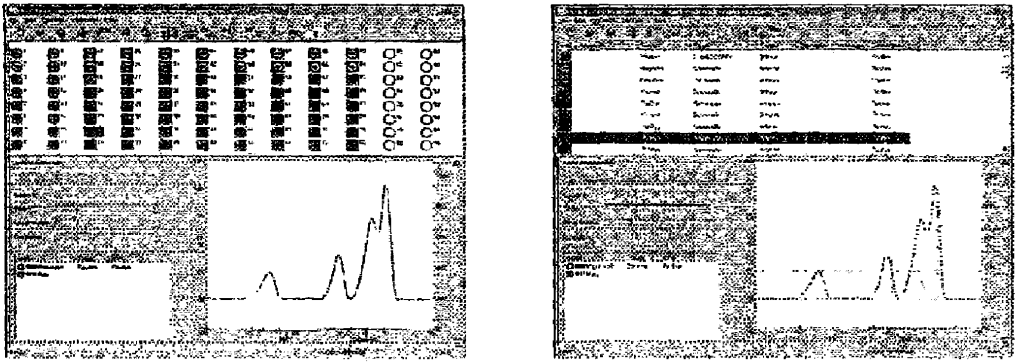


Рис. 19. Примеры форм вывода данных о результатах анализа на монитор

11.4. Оценка результатов при идентификации бактерий рода Salmonella

Кривая плавления для положительной реакции на бактерии рода Salmonella характеризуется тремя целевыми пиками на 85, 88 и 90 °С и наличием разницы между первым и третьим пиками не более 5 °С. При этом температурный диапазон составляет от 84 до 92 °С. Температурный диапазон контрольного пика составляет 75-83 °С.

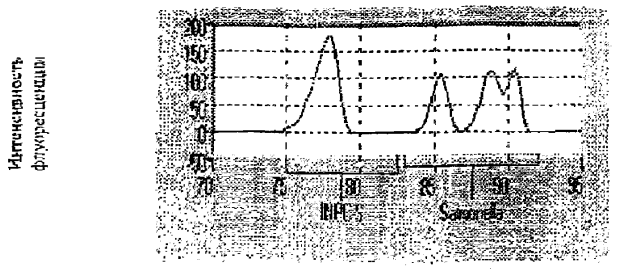


Рис. 20. Типичный график кривых плавления при получении положительн
зультата – при обнаружении бактерий рода Salmonella

Кривая плавления для отрицательной реакции на бактерии рода Sal
характеризуется отсутствием целевых пиков и высоким контрольным пиком

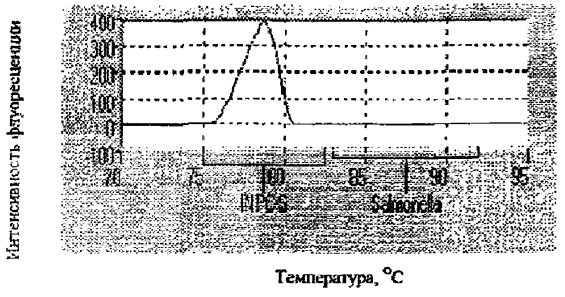


Рис.21. Типичный график кривых при отсутствии бактерий рода Salmonell
следуемой пробе

11.5. Оценка результатов при идентификации E. coli O157:H7

Кривая плавления для положительной реакции на E. coli O157.H7 ха
ризуется двумя целевыми пиками на 85 и 88,5 °С и наличием разницы межд
вым и вторым целевыми пиками в 3,5 °С. Температурный диапазон при эт
ставляет от 84 до 90°С. Обычно, первый пик ниже и шире второго, преобл
щего пика. Температурный диапазон контрольного пика составляет 77-82 °(

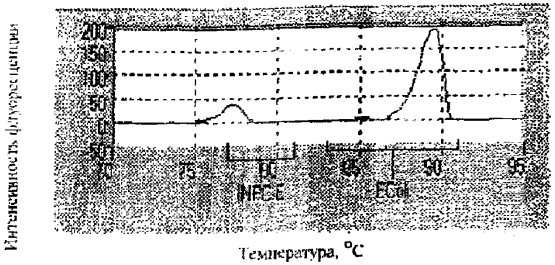


Рис.22. Типичный график кривых плавления при получении положительного результата – при обнаружении E . coli O157:H7

Кривая плавления для отрицательной реакции на E. coli O157:H7 характеризуется отсутствием целевых пиков и наличием крупного контрольного пика.

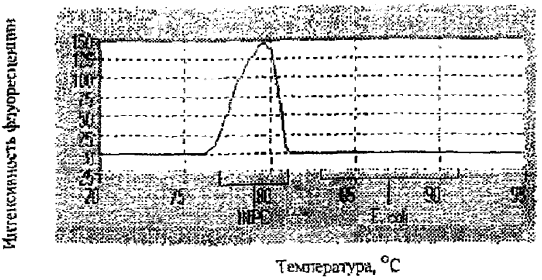


Рис.23. Типичный график кривых при отсутствии бактерий E. coli O157:H7 в исследуемой пробе

11.6. Оценка результатов при идентификации Listeria monocytogenes

Кривая плавления для положительной реакции на L. monocytogenes характеризуется одним целевым высоким пиком на 85°С. Температурный диапазон составляет от 83,5 до 86°С. Температурный диапазон контрольного пика составляет 77-81°С. Часто контрольный пик для L. monocytogenes выглядит как двойной.

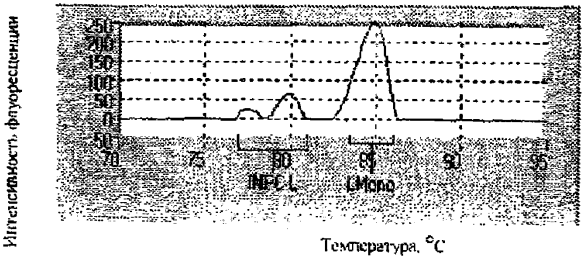


Рис.24. Типичный график кривых плавления при получении положительного результата – при обнаружении L. monocytogenes

Кривая плавления для отрицательной реакции на L.monocytogenes характеризуется отсутствием целевого пика с крупным контрольным пиком.

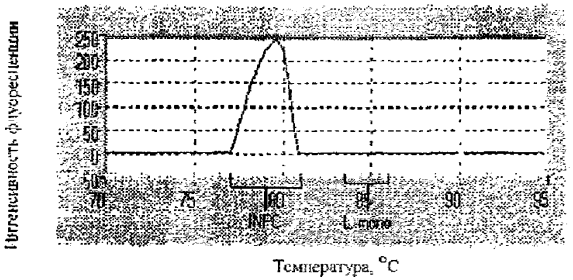


Рис.25. Типичный график кривых плавления при отсутствии бактерий L. monocytogenes в исследуемой пробе

11.7. Оценка результатов при идентификации бактерий рода Listeria

Кривая плавления для положительной реакции на бактерии рода Listeria характеризуется одним целевым пиком на 85,5°С. Температурный диапазон составляет от 83,5 до 87°С. Температурный диапазон контрольного пика составляет 81 °С.

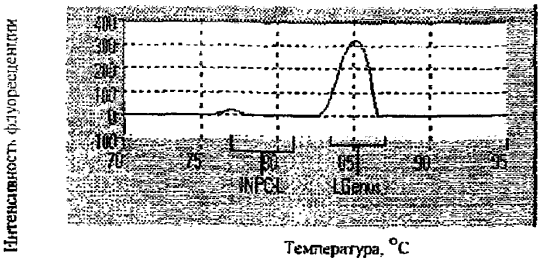


Рис.26.Типичный график кривых плавления при получении положительного результата – при обнаружении бактерий рода Listeria

Кривая плавления для отрицательной реакции на род Listeria характеризуется отсутствием целевых пиков и наличием крупного контрольного пика.

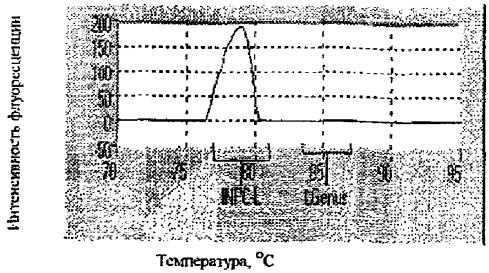


Рис.27. Типичный график кривых при отсутствии бактерий рода Listeria в исследуемой пробе

11.8. Оценка результатов при идентификации Campylobacter jejuni/coli/lari

Результаты идентификация Campylobacter jejuni/coli/lari дополняются количественным определением содержания клеток организма-мишени. Результаты идентификации представлены в верхней части окна в виде разноцветных значков. В нижней части окна представления результатов справа представлены графики, отображающие накопление продуктов амплификации для каждой мишени.

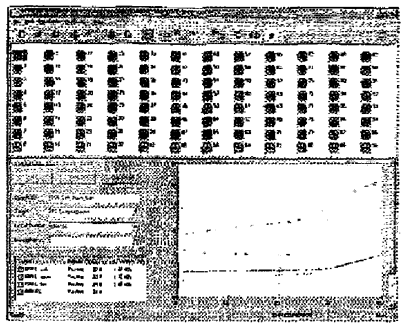


Рис.28. Пример формы вывода данных о результатах анализа на монитор

В нижней части окна представления результатов слева обозначены цветом данные для каждого целевого организма (C.coli, C.jejuni, C.lari):

- **Target** – проанализированные мишени, перечисленные в правой графе
- **Result** – положительный или отрицательный качественный результат
- **Ct** – номер цикла, в котором получен флуоресцентный сигнал, превышающий пороговый уровень

• **CFU/ml** – количественные данные о концентрации целевого организ исходном образце (взятом для лизиса).

Если концентрация клеток организма-мишени не достаточна для колич венного определения, результат будет представлен как "< 1.0E+04 for concer tions below the range" в случае, когда содержание клеток в биомассе ниже поро вого уровня, или ">1.0E+09 for concentrations above the range", в случае, когда держание клеток в биомассе превышает пороговый уровень.

11.9. Оценка невалидных результатов

В случаях, когда процесс лизиса и/или амплификации были проведен ошибками, могут возникнуть невалидные результаты, обозначенные значками или ⊘. Возникновение невалидных результатов может быть вызвано след щими причинами:

1. Размещение группы пробирок с образцами в ряду держателя, не соот ствующее указанному в текущем файле панели. Для устранения данной пробл заново маркируют ячейки в этом файле в соответствии с действительным рас ложением образцов в держателе, и выбирают команду OPERATION REANALYZE WELLS в строке меню. Данные о ячейках будут переопредел как указано.

2. Нестабильное электропитание прибора или центрального процессора обходимо убедиться в правильности подключения прибора к электросети, за нить ПЦР-пробирку и повторить анализ. Можно также установить шумоподав тель или сетевой фильтр между источником бесперебойного питания и прибор

3. Нарушение второго этапа процедуры лизиса (95°С) или отсутствие т летки в пробирке. Необходимо проверить температуру нагрева термостата, ко рая должна составлять 95±2 °С, вставив термометр в один из двух термобло нагревателя.

4. Ошибка в работе прибора, для преодоления которой необходимо про вести проверку работы оптической системы и при необходимости обратитьс службу технической поддержки.

12. Особенности проведения работ в ПЦР-лаборатории, контроль за контаминацией

Процесс амплификации приводит к накоплению миллионов копий фрагмента ДНК, специфичного для целевого организма. При открытии ПЦР-пробирок эти копии с аэрозолем и жидкостью распространяются по лаборатории. Система BAX® System Q7 с автоматизированной детекцией решает эту проблему, позволяя работать только с закрытыми пробирками. Для снижения риска распространения ампликонов и предотвращения контаминации необходимо соблюдать ниже перечисленные правила работы в соответствии с [16]:

- Не открывать ПЦР-пробирки после амплификации.
- Перед входом в рабочую зону снимать уже использованные перчатки. Заранее готовить новые перчатки, перед тем как покинуть рабочую зону.
- Сбрасывать наконечники с пипеток в пластиковый пакет и выносить его после каждого использования из рабочей зоны.
- Промывать рабочую зону после каждого использования дезинфицирующим средством («Дезолон» и др.).
- Для биологической защиты рабочей зоны использовать ультрафиолетовые облучатели до и после работы.
- Автоклавировать пипетки еженедельно согласно рекомендациям производителя (121 °С в течение 30 мин).
- Обрабатывать охлаждающие блоки в следующей последовательности: обработать дезинфицирующим средством («Дезолон» и др.), ополоснуть водой и протереть сухой салфеткой перед размещением в холодильнике.

Работы с системой BAX® Q7 включает использование вместе с исследуемыми образцами «чистой» пробы, которая служит отрицательным контролем анализа. Положительный результат для «чистой» пробы означает контаминацию.

Если контаминация произошла, вся рабочая зона должна быть тщательно вымыта. Для этого необходимо надеть перчатки и следовать перечисленным указаниям:

• Протереть наружные поверхности раствором дезинфицирующего средства ставить жидкость на поверхности примерно на 10 мин, затем вытереть насух норазовыми салфетками. После этого протереть поверхности 70%-ным этил спиртом. Облучить поверхности ультрафиолетом в течение ночи.

• Утилизировать все расходные материалы (наконечники для пипеток, раст реагентов и т.д.), которые были извлечены из упаковок и частично израсхо ны, путем автоклавирования в соответствии с МУ 1.3.1888-04 «Организация ты при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патоген биологическими агентами III-IV групп патогенности».

• Очистить наружные поверхности всех используемых приборов и инструм (термоциклер, пипетки и т.д.) с применением дезинфицирующего средс спирта.

• Проавтоклавировать пипетки и все использованные инструменты и присп ления, стойкие к автоклавированию, в соответствии с рекомендациями прс дителей (121 °С в течение 30 мин).

13. Библиографические ссылки

1. Методические указания «Лабораторная диагностика сальмонеллезов человека и животных, обнаружение сальмонелл в кормах, продуктах питания и объектах внешней среды», Москва, ВО «Агропромиздат», 1990, 59 с.

2. ГОСТ 30519-97 (ГОСТ Р 50480-93) «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella».

3. МУК 4.2 577-96 «Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов».

4. ГОСТ 7702.2.3-93 «Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьи. Метод выявления сальмонелл».

5. ГОСТ Р 50455-92 «Мясо и мясные продукты. Обнаружение сальмонелл (арбитражный метод)».

6. ГОСТ 21237-75 «Мясо. Методы бактериологического анализа».

7. ГОСТ 9958-81 «Изделия колбасные и продукты из мяса. Методы бактериологического анализа».

8. ГОСТ 30712-2001 «Продукты безалкогольной промышленности. Методы микробиологического анализа. Межгосударственный стандарт».

9. Методические указания МУК 4.2.762-99 «Методы микробиологического контроля готовых изделий с кремом».

10. МУК 4.2.1122-02 «Организация контроля и методы выявления бактерий рода Listeria monocytogenes в пищевых продуктах».

11 ГОСТ Р 51921-2002 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий Listeria monocytogenes».

12. МУК 4.2.2321-08 «Методы контроля Биологические и микробиологические факторы. Методы определения бактерий рода Campylobacter в пищевых продуктах».

13 МУК 4.2.992-00 «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Методы выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки E.coli O157:H7».

14 ГОСТ 30726-2001 «Продукты пищевые. Методы выявления и определ бактерий рода Escherichia coli».

15. «Методические указания по санитарно-бактериологическому контрол предприятиях общественного питания и торговли пищевыми продуктами» 1984

16 Организация работы лабораторий, проводящих исследования с патогенными логическими агентами III—IV групп патогенности методом полимеразной це реакции. МУ 1.3.1888—04.

gost.e-ecolog.ru