

# МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Cronobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii*) в продуктах питания методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс<sup>®</sup> *Cronobacter sakazakii*-FL»**

**АмплиСенс<sup>®</sup>**



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии  
Роспотребнадзора,  
Российская Федерация, 111123,  
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а



Только для исследовательских и  
иных немедицинских целей

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ .....	4
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия).....	6
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай) .....	10
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) .....	11
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США).....	15
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) .....	18
ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 4.1.022	
ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА ALA-1/4 С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 5.1.0 и ВЫШЕ.....	25
ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ПЦР-ДЕТЕКТОРОВ «ДЖИН» 2-х КАНАЛЬНОГО И «ДЖИН-4» 4-х КАНАЛЬНОГО .....	28
ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ FRT .....	30

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящих методических рекомендациях применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПО	- программное обеспечение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
FEP	- флуоресцентная детекция по «конечной точке»

## НАЗНАЧЕНИЕ

Методические рекомендации описывают порядок действий при использовании набора реагентов для выявления ДНК *Cronobacter sakazakii* в образцах продуктов питания методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Cronobacter sakazakii*-FL» совместно с:

приборами для ПЦР в режиме «реального времени»:

- Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) ;
- Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия);
- LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай);
- CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) ;
- iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США);
- «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);

### Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции (формат FRT)

Канал для флуорофора	Название канала детекции для разных моделей приборов <sup>1</sup>
Канал для флуорофора FAM	FAM/Green
Канал для флуорофора JOE	JOE/HEX/R6G/Yellow/Cy3

детекторами конечной флуоресценции:

- трехканальным и четырехканальным ALA-1/4 (Biosan, Латвия), при использовании программного обеспечения версии 4.x и 5.x,
- двухканальным и четырехканальными детекторам «Джин» («ДНК-технология», Россия).

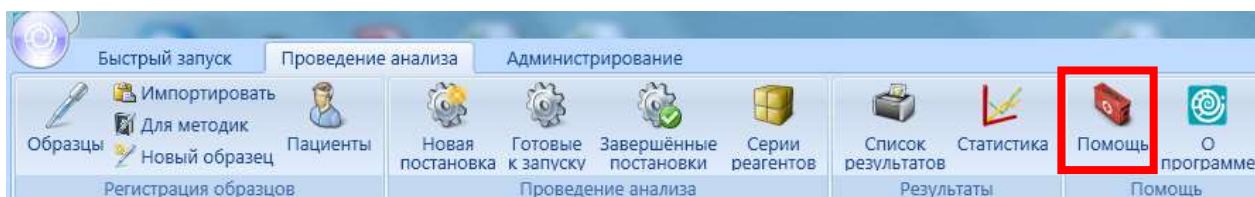
### Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции (формат FEP)

Канал для флуорофора	Название канала детекции для разных моделей приборов <sup>1</sup>
Канал для флуорофора FAM	FAM/Специфика
Канал для флуорофора JOE	HEX/ВК

**ВНИМАНИЕ!** Программирование амплификатора и анализ результатов, полученных в программном обеспечении амплификатора, могут быть выполнены автоматически с помощью Программного обеспечения FRT Manager («ИнтерЛабСервис», Россия). Для работы следует использовать программу FRT Manager версии 2.0 или выше. **Для ознакомления со всеми возможностями ПО FRT Manager рекомендуем прочитать полное руководство пользователя. Данное руководство**

<sup>1</sup> Название каналов детекции для соответствующего детектора см. в соответствующем разделе методических рекомендаций к набору реагентов.

располагается в меню «Помощь» вкладки «Проведение анализа» ПО FRT Manager.



См. также Методические Рекомендации по проведению амплификации и анализу результатов при помощи программного обеспечения FRT Manager («ИнтерЛабСервис», Россия) ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

## **ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия)**

Для работы с прибором Rotor-Gene 3000 следует использовать программу Rotor-Gene версии 6.1 или выше, с прибором 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.**

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) (детекция через дно пробирки).

### **Программирование амплификатора:**

1. Включить прибор, запустить программу Rotor-Gene.
2. Поместить пробирки или стрипы 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.

**ВНИМАНИЕ!** Лунка №1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*). Если в один ротор загружаются пробирки с реагентами от разных наборов реагентов или с разными ПЦР-смесями-FL, то в программе Rotor-Gene необходимо указать номера пробирок для калибровки по каждому каналу детекции. Рекомендации по калибровке изложены в информационном листе «Приоритеты калибровки для наборов реагентов АмплиСенс на амплификаторах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)».

3. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

### **Создание шаблона для проведения теста**

1. Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**.

2. Во вкладке выбрать шаблон **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл** для редактирования и нажать кнопку **New/Новый**.
1. В открывшемся окне выбрать ротор на 36 лунок **36-Well Rotor/36-луночный ротор** (или на 72 лунки **72-Well Rotor/72-луночный ротор**) и поставить галочку напротив позиции **No Domed 0,2ml Tubes / Locking Ring Attached/Кольцо закреплено**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
2. В открывшемся окне задать оператора и выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции – 25** мкл. Установить галочку напротив функции **15 µl oil layer volume/15 µL с добав. воска**. Нажать кнопку **Next/Далее**.
3. В окне **New Run Wizard/Мастер Нового Теста** необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля** и задать программу амплификации:

#### Программа амплификации

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	45
	60	25 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	10 с	–	

**ВНИМАНИЕ!** При одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

4. После того, как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку **OK/Да**.
5. Задать параметры калибрования (активировать **Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн.** в мастере нового эксперимента):
  - осуществлять калибрование перед первым измерением (активировать **(Perform Calibration Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции)**);
  - осуществлять измерение флуоресценции по каналам FAM/Green, JOE/Yellow: в поле **Channel setting/Установки канала** выбрать курсором канал и нажать кнопку **Добавить** справа от поля. В появившемся окне **Auto gain calibration channel settings/Авто-оптимизация уровня сигнала** установить калибровки канала (FAM/Green от 5FI до 10FI, JOE/Yellow – от 5 FI до 10FI) и нажать **OK**;
  - изменить калибровки установленных каналов на нужные можно, нажав **Edit.../Правка**. Нажать кнопку **Close/Заккрыть**.

**ВНИМАНИЕ!** Дополнительные требования к выставлению диапазонов калибровки каналов указаны в информационном листе «Приоритеты калибровки для наборов реагентов АмплиСенс на амплификаторах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)».

6. 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).
7. Внести данные в таблицу образцов (открывается автоматически после запуска амплификации). В колонке **Name/Имя** указать названия/номера исследуемых образцов. Отрицательный контроль ПЦР обозначить как «К-», положительный – «К+». Напротив всех исследуемых биологических образцов установить тип **Unknown/Образец**, положительных контролей – тип **Positive control/Положительный контроль**, для отрицательного контроля выделения – тип **Negative control/Отрицательный контроль**, отрицательного контроля ПЦР – тип **NTC/ОТР. (ПФ)**. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**. Нажать кнопку **Finish/OK/Закончить**.

**ВНИМАНИЕ!** При установке типа **None/Пусто** данные для образца анализироваться не будут!

Примечание – Для редактирования таблицы образцов до старта нужно, чтобы предварительно в меню **File/Файл** подменю **User preferences/Предпочтения** был выбран пункт **Edit Samples Before Run Started/Редактировать образцы перед стартом теста**.

### **Анализ результатов**

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора Rotor-Gene. 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.

### **Анализ результатов амплификации по каналам FAM/Green, JOE/Yellow**

1. Активировать нажатием в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, активировать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать** и **Cycling A. FAM/Cycling A. Green, Show/Показать**.
2. Отменить автоматический выбор уровня пороговой линии для каждого из



- основных открывшихся окон (FAM/Green и JOE/Yellow) **Threshold/Порог**.
3. Выбрать линейный тип шкалы (**Linear scale/Линейная шкала**).
  4. В меню каждого основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.
  5. В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) для каждого из основных окон выставить уровень пороговой линии **Threshold/Порог = 0,05**.
  6. Выбрать параметр **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** и установите значение порога отрицательных проб (**NTC Threshold/Порог Фона – ПФ (NTC)**) равным **10 %**.
  7. В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения *Ct*.

### **Интерпретация результатов**

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

**ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай)**

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской крышкой (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) (детекция через дно пробирки).

**Запуск прибора и анализ результатов проводить при помощи программного обеспечения FRT Manager.**

## ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) (детекция через крышку пробирки).

### Программирование амплификатора:

1. Включить прибор и блок питания оптической части прибора.

**ВНИМАНИЕ!** Лампа должна быть прогрета до запуска эксперимента не менее 15 мин.


2. Запустить программу iCycler iQ5.

3. Поместить пробирки или стрипы в реакционный модуль амплификатора и запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

**ВНИМАНИЕ!** Следите за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивайте пробирки (стрипы) при установке в прибор.

### Создание шаблона для проведения теста.

1. Задать схему планшета (расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала в исследуемых образцах):

- в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New**;
- в открывшемся окне нажать кнопку **Whole Plate loading** и задать схему планшета, используя кнопки верхней панели. Указать имя проб в столбце **Identifier/Condition** в появившейся строке в нижней части экрана. Выбрать измерение флуоресцентного сигнала по каналам FAM, JOE/HEX. Нажать кнопку **Select/Add Fluorophores** и в открывшемся окне выбрать флуорофор, отметив его в графе **Selected** галочкой. Нажать **OK**. В окне **Fluorophore** появится название канала. Чтобы добавить измерение флуоресцентного сигнала к каждой пробе, необходимо нажать на флуорофор, чтобы он был активен, и, используя кнопку **Fluorophore loading in whole Plate mode**  над схемой, выделить пробы на планшете;

- 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**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.
2. Все биологические образцы обозначить как **Unknown**, положительные контроли как «+», отрицательные контроли как «-».
  3. Задать программу амплификации. Для этого в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.

#### Программа амплификации

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	45
	60	25 с	FAM, JOE/HEX	
	72	10 с	–	

**ВНИМАНИЕ!** При одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам

4. Перед запуском выполнения программы необходимо проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Для измерения факторов лунок вариант **Use Persistent Well Factors** (предлагается по умолчанию). Нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперименту (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.
5. После окончания программы необходимо закрыть программу и выключить прибор (амплификатор и блок оптической системы).

#### Использование готового шаблонного файла для проведения теста

При последующих постановках для запуска прибора можно использовать ранее заданные параметры для проведения теста и ранее заданную схему планшета. Для этого:

- в модуле в **Workshop** выбрать в верхнем левом окне необходимый файл постановки;
- в блоке **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Edit** и отредактировать схему планшета (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **SampleFiles**);
- в блоке **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Edit** и проверить

правильность выбранного протокола (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **Users**).

### **Анализ результатов:**

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора iCycler iQ5. 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.

1. Запустить программу, выбрать нужный файл с данными анализа в окне **Data File** модуля **Workshop** и нажать кнопку **Analyze**;
2. Выбрать режим анализа данных **Analysis Mode: PCR Base Line Subtracted Curve Fit** (установлен по умолчанию);
3. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия должна пересекать только S-образные (сигмообразные) кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить вручную уровень пороговой линии для каждого канала. Для этого нужно нажать кнопку **Log View** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для любого положительного контроля в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для положительного контроля показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.
4. Для анализа результатов нажать кнопку **Results** (расположена под кнопками с названиями флуорофоров).
5. Для дальнейшей работы с данными щелкнуть правой кнопкой мыши на появившейся таблице с результатами. В выпадающем меню выбрать **Export to Excel**, сохранить файл в необходимую папку.

### **Интерпретация результатов**

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в

соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

## ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Био-Рад Лабораториз, Инк.), США)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) (детекция через крышку пробирки).

### Программирование амплификатора

1. Включить прибор и запустить программу Bio-Rad CFX Manager.
2. Запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора.

### Создание шаблона для проведения теста

1. В стартовом окне **Startup Wizard** необходимо выбрать позицию **Create a new Run/Experiment** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run/Experiment...**). Нажать **OK**.
2. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor - New** задать параметры амплификации. Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл.**

#### Программа амплификации

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	45
	60	25 с	FAM, HEX	
	72	10 с	–	

**ВНИМАНИЕ!** При одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам

**ВНИМАНИЕ!** Для каждого шага этапов циклирования, нажав на кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec**.

3. Сохранить протокол: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Protocol Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
4. Задать схему планшета. Во вкладке **Plate** нажать кнопку **Create new**. В появившемся окне **Plate Editor - New** задать расположение пробирок в модуле. Нажав кнопку **Select Fluorophores**, выбрать галочками в колонке **Selected** флуорофоры: **FAM, HEX** и нажать **OK**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown** для всех образцов. Затем задать галочками в колонке **Load** (в правой части окна) измерение флуоресцентного сигнала для всех образцов по необходимым

каналам. В окне **Sample name** задать название образцов, при этом параметр **Load** должен быть отмечен галочкой.

5. Сохранить схему планшета: выбрать **File** и далее **Save As** в окне **Plate Editor New**, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.
6. Выбрать вкладку **Start Run**. Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

**ВНИМАНИЕ!** Следите за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивайте пробирки (стрипы) при установке в прибор.

7. Запустить выполнение выбранной программы с заданной схемой планшета, нажав на кнопку **Start Run**, выбрать директорию для сохранения файла постановки, ввести имя файла, нажать **Сохранить**.

### **Использование готового шаблона для проведения теста**

При последующих постановках для запуска прибора можно использовать ранее заданные параметры для проведения теста и ранее заданную схему планшета. Для этого:

- в окне **Run Setup** во вкладке **Protocol** нажать кнопку **Select Existing...**, в окне **Select Protocol** выбрать необходимый файл с программой амплификации, нажать кнопку **Открыть**;
- в окне **Run Setup** перейти во вкладку **Plate**, нажать кнопку **Select Existing...**, в окне **Select Plate** выбрать необходимый файл со схемой планшета, нажать кнопку **Открыть**. Отредактировать схему можно, нажав на кнопку **Edit selected**.

### **Анализ результатов**

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора CFX96. 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.

1. Запустить программу, открыть сохраненный файл с данными анализа. Для этого выбрать в меню **File**, затем **Open** и **Data file** и выбрать необходимый файл.



2. В окне **Data Analysis** во вкладке **Quantification** представлены кривые флуоресценции, расположение пробирок в планшете и таблица со значениями пороговых циклов.

Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия должна пересекать только S-образные (сигмообразные) кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить вручную уровень пороговой линии для каждого канала. Для этого нужно поставить галочку напротив пункта **Log Scale** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для любого положительного контроля в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для положительного контроля показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала. Чтобы выделить график образца «K+» (или другого желаемого образца) установить курсор в схеме планшета, либо в таблице результатов.

3. Нажав на кнопку панели инструментов **View/Edit Plate...**, задать в появившемся окне название образцов.
4. Для дальнейшей работы с данными можно скопировать результаты значений *Ct* для всех каналов в таблицу Excel из таблицы со значениями программного обеспечения прибора. Для формирования отчета о постановке в формате **.pdf** необходимо выбрать на панели инструментов **Tools**, далее **Reports...** и сохранить сформированный документ, выбрав **File** и далее **Save As**, задать имя файла, нажать **Сохранить**.

### **Интерпретация результатов**

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

## ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)

Провести этапы пробоподготовки и приготовления реакционных смесей согласно инструкции к набору реагентов. Для проведения амплификации рекомендуется использование тонкостенных пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирок объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) (детекция через крышку пробирки).

### Программирование амплификатора:

1. Включить прибор, запустить программу RealTime\_PCR v.7.3, запрограммировать прибор согласно инструкции изготовителя прибора. В стартовом окне необходимо выбрать существующего оператора или добавить нового оператора и выбрать режим **Работа с прибором**.
2. В диалоговом окне **Список приборов** выбрать необходимый прибор и нажать кнопку **Подключить**.

### Создание шаблона для проведения теста

1. В меню **Тест** на верхней панели выбрать команду **Создать/Редактировать тест**, ввести название нового теста «ОК1» и нажать кнопку **ОК**. В появившемся окне **Тест** задать следующие параметры:
  - **Тип** – качественный;
  - **Метод** – **Пороговый (Ct)**;
  - **Пробирки** – отметить галочкой **образец, контроль+, контроль–**,
  - **Контроли**: положительный (К+) – 1; отрицательный (К–) – 1;
  - **Объем рабочей смеси в пробирке** – 25 мкл.
  - **Флуорофоры** – **Fam, Hex** (для версии программы v.7.3.2.2 и выше выбрать R6G).
  - Задать программу амплификации. Для этого в окне **Тест** нажать кнопку **Создать новую программу**, задать параметры амплификации и сохранить шаблон, нажав кнопку **ОК**. Ввести имя файла, нажать кнопку **Сохранить**.

#### Программа амплификации

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	45
	60	25 с	Fam, Hex/R6G	
	72	10 с	–	

**ВНИМАНИЕ!** При одновременном проведении других тестов назначается детекция

и по другим используемым каналам).

2. В окне **Тест** нажать кнопку **ОК**.
3. Выбрать вкладку **Протокол**. Нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «**ОК1**», указать количество образцов, нажать **ОК**.
4. Присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** в появившейся таблице. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, поставив галочку напротив функции **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**.
5. В открывшейся вкладке **Запуск программы амплификации**, указать **объем рабочей смеси –25 мкл** и нажать кнопку **Запуск программы**.
6. Нажать кнопку **Открыть блок** и установить пробирки в строгом соответствии с указанным расположением пробирок в рабочем блоке прибора.

**ВНИМАНИЕ!** Следите за тем, чтобы на стенках пробирок не оставалось капель, так как падение капли в процессе амплификации может привести к сбою сигнала и усложнить анализ результатов. Не переворачивать пробирки (стрипы) при установке в прибор.

7. Последовательно нажать кнопки **Закрыть блок** и **Запуск программы**. Сохранить эксперимент. Поставить при необходимости галочку **Выключить прибор по завершении амплификации**.

### **Использование готового шаблонного файла для проведения теста**


Для запуска прибора можно также использовать ранее созданный шаблон теста с заданными параметрами амплификации и заданным количеством контролей. Для этого:

- во вкладке **Протокол** нажать кнопку **Добавить тест** и в появившемся окне выбрать название «**ОК1**», указать количество образцов, нажать **ОК**;
- присвоить имена образцам в графе **Идентификатор** в появившейся таблице. Указать расположение пробирок в рабочем блоке прибора, поставив галочку напротив функции **Свободное заполнение**, сняв предварительно галочку с функции **Автозаполнение**. Нажать кнопку **Применить**;
- в меню **Запуск программы амплификации** проверить правильность выбранной программы амплификации и объема реакционной смеси, заданных в шаблоне теста.

### **Анализ результатов**

Полученные результаты анализируются с помощью программного обеспечения прибора «ДТ-96». 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  $C_t$  в соответствующей графе таблицы результатов.

1. Открыть сохраненный файл с данными анализа.
2. Указать в выпадающем списке **Тип анализа:  $C_t(C_p)$  для всех каналов**.
3. Указать в выпадающем списке **Метод: Пороговый ( $C_t$ )**.
4. Нажать кнопку **Изменить параметры анализа**  и выставить:
  - **Критерий положительного результата ПЦР – 90 %**,
  - **Величина Threshold – 10 StD на участке линейного фитирования**
  - **Критерии достоверности результата: поставить галочку, нижняя граница/порог положительного результата – 10 %, верхняя граница/порог нормализации данных – 30 %.**
  - **Нормализация данных** – не использовать (по умолчанию галочка в соответствующем окне отсутствует).

Нажать кнопку **Применить**.

5. **Отключить Фитирование (сглаживание) данных при помощи кнопки  $\Phi$  (отжать кнопку).**
6. Для каждого канала проверить правильность автоматического выбора пороговой линии. Пороговая линия (**Threshold**) должна пересекать только S-образные (сигмообразные) кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать базовую линию. В случае если это не так, необходимо установить вручную уровень пороговой линии для каждого канала. Для этого нужно внизу окна программы поставить галочку в поле **Log\_Y** (переключение в логарифмический вид) и установить уровень пороговой линии (левой кнопкой мыши) на таком уровне, где кривые флуоресценции носят линейный характер и отсутствует пересечение с кривыми отрицательных образцов. Как правило, пороговая линия устанавливается на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца любого положительного контроля в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции положительного контроля показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

### **Интерпретация результатов**

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены

правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. инструкцию) и граничными значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводят в соответствии с инструкцией и вкладышем к набору реагентов.

## ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия) С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 4.1.0

Работа с флуоресцентным ПЦР-детектором ALA-1/4 проводится согласно инструкции по эксплуатации к прибору.

Детекция и интерпретация результатов проводится в соответствии с настройками теста, указанными во вкладыше к набору реагентов. Для проведения детекции и интерпретации результатов необходимо в программе «ALA\_1» создать новый тест «**Crono**».

**ВНИМАНИЕ!** Пробы амплифицировать сразу после соединения реакционной смеси и ДНК-пробы и контролей! Время внесения проб в реакционную смесь и запуск реакции на приборе не должно превышать 10-15 мин.

### Установка параметров теста «**Crono**»

1. Запустить программу ALA\_1 на компьютере, присоединенном к прибору.
2. В главном меню программы выбрать **Настройки** → **Тест-система**.
3. Нажать кнопку **Новый** (в верхнем правом углу).
4. В открывшемся меню задать название теста «**Crono**», нажать кнопку **OK**.
5. В группе параметров **Каналы** отметить галочкой все задействованные в тесте каналы (FAM, HEX).

В полях «**п-**» и «**п+**» установить пороговые значения для отношения сигнал/фон по каждому каналу для детекции специфической ДНК (см. вкладыш к набору реагентов).

6. Ввести названия мишеней в блок параметров **Привязка каналов** и соотнести их с каналами детекции. Для этого напечатать название мишени в свободное поле и нажать клавишу **Добавить**, при этом новая мишень появится в столбце уже существующих в памяти прибора мишеней. Название мишени в столбце **Привязка каналов** выделить курсором и нажать соответствующую ей кнопку канала для детекции:

**ВКО = FAM;**


**Cronobacter sakazakii = HEX.**

7. В поле **Доверительный интервал** установить значение 555 %.
8. Настройки теста можно просмотреть и изменить, выбрав опцию **Список тестов** в главном меню **Настройки**.
9. Нажать кнопку **Сохранить**.

### Измерение флуоресцентного сигнала

1. Включить прибор и запустить программу ALA\_1 на компьютере, присоединенном

к прибору.

2. Задать протокол измерения. Для этого в главном меню выбрать **Протокол** → **Создать новый** или **Открыть**, чтобы открыть созданный ранее протокол.
3. В окне протокола необходимо выбрать тип используемого ротора (36 x 0,5 или 48 x 0,2), ввести номер протокола, выбрать нужный тест **«Crono»** в меню-вкладке **Тест** и ввести последовательность детектируемых образцов (в колонке **Образец**).
4. Обозначить образцы, которые являются фоновыми для данной группы образцов, как **фон** (используя сочетание клавиш Ctrl+F). В качестве образцов, обозначенных «ФОН» использовать пробирки с образцами «ФОН».
5. Закрыть окно редактирования протокола, нажав на кнопку **Exit** в верхнем левом углу панели. Протокол сохранить.
6. Поставить пробирки в ячейки ротора в соответствии с заданной последовательностью, установить ротор в модуль прибора, закрепить его фиксатором и закрыть крышку. Запустить детекцию, выбрав в меню **Протокол** → **Детекция** или значок  **Детекция по протоколу** на панели инструментов (вверху экрана). По окончании измерения на экран будет выведена таблица результатов.

Примечание – Если в одном протоколе проводится детекция более 36 (48) образцов, то после окончания детекции партии из 36 (48) образцов необходимо извлечь ротор, поместить в него следующую группу образцов, поставить ротор в прибор и для продолжения детекции нажать кнопку **Продолжить** в окне программы.

### Интерпретация результатов

Полученные данные интерпретируются автоматически с помощью программы ALA\_1. Результаты в таблице представляются с помощью следующих обозначений:

1. Первый столбец (канал 1, FAM):
  - **«ВКО+»** указывается для образцов, в которых обнаружена ДНК ВКО-FL;
  - **«ВКО–»** указывается для образцов, в которых ДНК ВКО-FL не обнаружена.
2. Второй столбец (канал 2, HEX):
  - **«Cronobacter – обнаружено»** (на лиловом фоне) указывается для образцов, в которых обнаружена ДНК *Cronobacter sakazakii*;
  - **«Cronobacter – не обнаружено»** (на голубом фоне) указывается для образцов, в которых ДНК *Cronobacter sakazakii* не обнаружена.
3. При получении результатов, которые нельзя однозначно интерпретировать:

- «**сомнительно**» – сигнал по каналу 2-HEX, отведенному для детекции специфической ДНК, превышает пороговое значение, допустимое для отрицательных образцов, но не превышает пороговое значение для положительных образцов;
- «**Cronobacter - нд**» – в образце не детектируется ни специфический сигнал, ни сигнал ВКО.

Для таких образцов требуется повторное проведение анализа.



## ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПЦР-ДЕТЕКТОРА ALA-1/4 С ВЕРСИЕЙ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ 5.1.0 и ВЫШЕ

Работа с флуоресцентным ПЦР-детектором ALA-1/4 проводится согласно инструкции по эксплуатации к прибору.

Детекция и интерпретация результатов проводится в соответствии с настройками теста, указанными во вкладыше к набору реагентов. Для проведения детекции и интерпретации результатов необходимо в программе «ALA\_1» создать новый тест **«Crono»**.



1. Включить прибор и запустить программу ALA\_1 на компьютере, присоединенном к прибору.
2. Тест для обнаружения *Cronobacter sakazakii* может быть предустановлен в программе «АЛА-1».
3. Проверить наличие теста **«Crono»** в списке настроенных тестов можно, выбрав в основном меню программы **Настройки** → **Настройка тестов**. В появившемся окне **Окно настройки тестов** в таблице **Список тестов** найти тест **«Crono»**.
4. Если тест **«Crono»** не был предустановлен в программе ALA-1, то для проведения детекции и интерпретации результатов необходимо создать новый тест или импортировать его через архивный файл в список тестов, используемых на программе ALA\_1.

**ВНИМАНИЕ!** Импорт или создание новых тестов в программе ALA\_1 возможно только для пользователей с правами администратора.


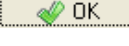
### Импортировать новый тест

Импорт новых тестов в программе ALA\_1 осуществляется через выбор основного меню **Настройки** → **Импорт тестов**. Далее выбрать архивный файл в формате \*.zip и импортировать его в программу.

### Создать новый тест

- Выбрать в основном меню программы **Настройки** → **Настройка тестов**. В появившемся окне **Окно настройки тестов** добавить название нового теста **«Crono»** кнопкой  **Добавить** в таблице **Список тестов**.
- В поле **Каналы для данной реакционной смеси и их обозначения** задать каналы детекции: FAM и HEX. Для этого в таблице **Список каналов** выбрать канал FAM и нажать стрелку  **Добавить**. Выбранный канал появится в таблице **Каналы и обозначения**, под таблицей в поле **Обозначения** задать обозначения по этому каналу - «ВКО» установить значение порога >3,0. Далее

для канала HEX задать обозначения по этому каналу **«Сропо»**, в поле пороги для «+» и «-» задать «3,0» и «2,5» соответственно. Далее в поле **Введите/измените тип теста** выбрать тип теста **Общий**.

- Отметить контроли, использующиеся в этом тесте: «ОКО» (отрицательный контроль выделения), «К+» (положительный контроль амплификации), «К-» (отрицательный контроль амплификации). Выбрать алгоритмы интерпретации для контролей по умолчанию.
- В поле **Таблица интерпретации результатов** нажать кнопку  **Создать**. Программой ALA\_1 будет автоматически создана таблица возможных вариантов сочетаний результатов детекции для всех каналов и итоговый результат для каждого из этих вариантов. Продолжением этой таблицы являются возможные варианты сочетаний результатов контролей. Результаты детекции клинических образцов и контролей будут выдаваться после измерения в соответствии с этой таблицей. Сохранение теста и закрытие окна осуществляется кнопкой  **ОК**.

#### 5. Создать протокол измерения.

- В основном окне программы нажать кнопку  **Новый протокол**. В появившемся окне **Окно настройки протокола** выбрать тест **«Сропо»** из списка доступных тестов и нажать стрелку  **Добавить** **Добавить**. Выбранный тест появится в списке **Тесты протокола**.
  - В поле **Количество образцов** задать количество исследуемых образцов без контрольных образцов и образцов **Фон**, нажать кнопку  **Добавить**. В поле **Количество фоновых пробирок** выбрать их необходимое количество.
  - В **Таблице имён образцов, фоновых пробирок и контролей** задать имена образцов, добавить необходимое количество контролей. В поле **Тип ротора** выбрать ротор, который будет использоваться в данном протоколе. Сохранение протокола и закрытие окна осуществляется кнопкой  **ОК**.
6. Поставить пробирки в ячейки модуля прибора ALA-1/4 в соответствии с заданной последовательностью. Запустить измерение, нажав на кнопку  **Измерить** в панели активных кнопок (вверху экрана).

#### Интерпретация результатов

Результат измерения выдаётся программой после завершения измерения протокола в окне **Окно результатов**. Полученные данные интерпретируются

программой автоматически в соответствии с **Таблицей интерпретации результатов**:

- «**ОБНАРУЖЕНО**» указывается для образцов, в которых обнаружена ДНК *Cronobacter sakazakii*;
- «**Не обнаружено**» указывается для образцов, в которых не обнаружена ДНК *Cronobacter sakazakii*;
- «**Невалидный**» указывается при получении результата детекции, который нельзя однозначно интерпретировать. Для таких образцов требуется повторное проведение анализа;
- «**Сомнительный**» указывается для образцов, у которых сигнал по каналу HEX, отведенному для детекции специфической ДНК, превышает пороговое значение, допустимое для отрицательных образцов, но не превышает пороговое значение для положительных образцов. Для таких образцов требуется повторное проведение анализа.

## ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ПЦР-ДЕТЕКТОРОВ «ДЖИН» 2-х КАНАЛЬНОГО И «ДЖИН-4» 4-х КАНАЛЬНОГО


Детекция с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора «Джин» проводится согласно описанию в паспорте «Детектор полимеразной цепной реакции флуоресцентный Джин».

Для детекции и интерпретации результатов используются следующие настройки теста:

- Наименование теста - **«Crono»**.
- Специфика по каналу **Hex (ПО 4.4I) / BK (ПО 3/3I)**, внутренний контроль по каналу **Fam (ПО 4.4I) / Специфика (ПО 3/3I)**.
- Пороговые значения для канала **FAM/Специфика** должны составлять  $>3,0$ ; для канала **Hex/BK** - **«п-»** = 2,5 и **«п+»** = 3,0.

Настройки теста можно просмотреть, выбрав в меню **Настройки** опцию **Список местов**. Если значения изменены, требуется восстановить начальные значения, указанные выше, и сохранить изменения при выходе из программы.

### Проведение детекции

1. Включить прибор и запустить программу Gene на компьютере, присоединенном к прибору.
2. Задать протокол измерения. Ввести количество измеряемых образцов и количество фоновых пробирок (**2**), выбрать тест **«Crono»** в графе **Тест**, нажать кнопку **OK** (кнопкой мыши) и ввести последовательность детектируемых образцов (в колонке **Образец**).
3. В качестве образца, обозначенного **ФОН** использовать контрольный образец «Фон».
4. Поставить пробирки в ячейки модуля прибора «Джин» или «Джин-4» согласно заданной последовательности (по 12 образцов на каждый цикл детекции), закрыть крышку прибора. Запустить измерение, нажав на значок  (вверху экрана). По окончании измерения вынуть пробирки и нажать **OK**.

### Интерпретация результатов

1. Результаты автоматической интерпретации ПЦР-детектора «Джин» 2-х канального **не используются**. Анализ полученных результатов проводить согласно инструкции и вкладышу.
2. Для «Джин» 4-х канального полученные данные интерпретируются автоматически с помощью программы «Gene» (колонка **Результат** на экране):

- знаком «+» (на красном фоне) обозначаются положительные образцы;
- знаком «-» (на зеленом фоне) – отрицательные образцы;
- знаком «?» обозначается результат, который нельзя однозначно интерпретировать (сигнал по каналу, отведенному для детекции специфической ДНК, превышает пороговое значение, допустимое для отрицательных образцов, но не превышает пороговое значение для положительных образцов (сигнал в так называемой «серой зоне»);
- «нд» обозначается недостоверный результат (в образце не детектируется (не превышает заданного порогового значения) ни специфический сигнал, ни сигнал ВКО).

### ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ FRT

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла ( $C_t$ ) по каналу для флуорофора JOE превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *Cronobacter sakazakii*.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу флуорофора JOE и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE значение порогового цикла ( $C_t$ ) меньше граничного значения. Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Cronobacter sakazakii*, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Положительные результаты тестирования отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК – стерильный образец культуральной среды) могут быть связаны с загрязнением среды для первичного обогащения генетическим материалом тестируемого микроорганизма. В этом случае необходимо повторить исследование с этапа первичного обогащения с применением сред не содержащих ДНК искомого микроорганизма с дополнительным включением в панель в качестве отрицательного контроля выделения препарата ОКО.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

### Лист вносимых изменений

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
25.07.11 VV	Титульная страница	Добавлен символ, обозначающий «изделие для <i>in vitro</i> диагностики»
	Нижний колонтитул	«Кат. №» и «дата изменения» заменены на соответствующие символы
	По тексту	«Вариант FEP/FRT» исправлен на «формат FEP/FRT»
30.09.11 LA	Титульная страница	Добавлены символ, наименование и адрес производителя
		Символ «Изделие для <i>in vitro</i> диагностики» перемещен в правый нижний угол страницы
	По тексту	Удалена информация из нижнего колонтитула Исправления по шаблону
27.01.12 VV	Титульная страница	символ <b>IVD</b> , обозначающий «изделие для <i>in vitro</i> диагностики» заменен на символ <b>RUO</b> «только для исследовательских целей»
25.06.13 ME	Назначение	Добавлены таблицы «Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции» для форматов FEP и FRT
	По тексту	Название каналов исправлены согласно протоколу № 20 от 26.02.13
03.10.14 PM	Назначение	В список приборов для ПЦР в «режиме реального времени» добавлен прибор CFX96 (Bio-Rad, США) и удалены приборы $\square$ Mx3000P, Mx3005 (Stratagene);
	ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия)	В разделе «Анализ результатов» в п.7 добавлена фраза: «Пробы, в которых появились значения <i>Ct</i> , не превышающие граничные значения, указанные во вкладыше, считаются положительными.», в п.6 ««ОКО», «К+», «К-» в соответствии с пороговыми значениями <i>Ct</i> ( <i>Ct</i> порог), указанными во вкладыше к комплекту реагентов.» изменено на «ОК, К+, К- (см. инструкцию и вкладыш к набору реагентов)»
	ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ, АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad, США)	В разделе «Анализ результатов» удалены пп. 6 и 7, в п. 8 удалено: «Если значение <i>Ct</i> в пробе превышает значения порогового цикла, то результат считается сомнительным, необходимо провести дополнительное исследование данного образца ДНК в двух повторах.»
	Проведение амплификации, анализ и учет результатов при помощи прибора CFX96, CFX96 Touch (Bio-Rad, США)	Раздел добавлен
	По тексту	В Анализе результатов «пороговые значения <i>Ct</i> » заменены на «граничные значения <i>Ct</i> »
27.01.15 ChA	Титульный лист	Для символа <b>RUO</b> добавлена надпись «Только для научно-исследовательских целей»
02.02.15 BO	Титульный лист	Для символа <b>RUO</b> изменена надпись «Только для научно-исследовательских целей» на «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
14.04.16 PM	Назначение	Разделы переработаны в соответствии с шаблоном. Добавлены программы амплификации
	Проведение амплификации и анализ результатов при помощи приборов Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия)	
	Проведение реакции амплификации, анализ и учет результатов при помощи прибора iCycler iQ5 (Bio-Rad, США)	
	Проведение амплификации и анализ результатов при помощи прибора CFX96 (Bio-Rad, США)	
	Список сокращений	Разделы добавлены
	Проведение амплификации и анализ результатов при помощи прибора LineGene 9660 (BIOER TECHNOLOGY CO., LTD, Китай)	
Проведение амплификации и анализ результатов при помощи прибора «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)		
Возможные ошибки		
20.06.18 PM	По тексту	«Производитель» заменен на «Изготовитель». «Учет результатов» замен на «Интерпретация результатов»
16.12.19 VA	Нижний колонтитул	Добавлен каталожный номер <b>REF</b> E-2911-3