



Х. ЕВЕРЖАЮ

Председатель Правления-Ректор
НАО «КРУ им. А. Байтурсынова»
С. Куанышбаев

10 2023 г.

СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ

**НАБОР «МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ
ВЫЯВЛЕНИЯ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И *STREPTOCOCCUS
AGALACTIAE* В МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛОКУСОВ
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ»**

СО 034-2023

Костанай

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН испытательным центром научно-исследовательского института прикладной биотехнологии.

2 ВНЕСЕН испытательным центром научно-исследовательского института прикладной биотехнологии.

3 УТВЕРЖДЕНО И ВВЕДЕНО В ДЕЙСТВИЕ приказом Председателя правления - ректора от 05.10.2023 г. № 191 ОД

4 РАЗРАБОТЧИКИ:

Г. Чужебаева – заведующий испытательным центром научно-исследовательского института прикладной биотехнологии;

Б. Байменов – научный сотрудник научно-исследовательского института прикладной биотехнологии.

5 ЭКСПЕРТЫ:

Ж. Жарлыгасов - проректор по исследованиям, инновациям и цифровизации, кандидат сельскохозяйственных наук;

М. Хасанова – секретарь ученого совета, доктор PhD, и.о. ассоциированного профессора кафедры ветеринарной медицины;

6 ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ

3 года

7 ВВЕДЕНО:

впервые

Настоящий стандарт организации не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен без разрешения председателя правления - ректора НАО «Костанайский региональный университет имени А.Байтурсынова»

Содержание

1	Область применения.....	4
2	Нормативные ссылки.....	4
3	Определения.....	6
4	Обозначения и сокращения.....	7
5	Ответственность и полномочия.....	7
6	Технические (технологические) требования к набору.....	8
7	Биологические (биохимические, биофизические) требования.....	10
8	Требования к сырью и материалам, используемым для контроля набора.	10
9	Требования к упаковке и маркировке.....	11
10	Риски, возникающие при использовании набора.....	13
11	Требования к безопасности и охране окружающей среды.....	14
12	Правила приёмки.....	15
13	Методы контроля.....	16
14	Транспортировка и хранение.....	21
15	Указания к применению.....	22
16	Гарантии организации-производителя.....	22
17	Пояснительная записка к техническим условиям	22
	Приложение А Инструкция по применению	24
	Приложение А Акты комиссионных испытаний	25

Глава 1. Область применения

1.1 Настоящий стандарт организации (СО) устанавливает общие требования и определения для амплификации последовательностей нуклеиновых кислот (ДНК) *in vitro*. Настоящий стандарт организации распространяется на набор (далее по тексту набор) для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определение локусов антибиотикорезистентности методом полимеразной цепной реакции, с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (ПЦР-РТ).

1.2 В основе метода лежит многократное повторение циклов денатурации ДНК в исследуемой пробе, отжига специфических олигонуклеотидных затравок (праймеров) и синтеза комплементарных цепей ДНК с помощью фермента.

1.3 Требования настоящего стандарта организации являются обязательными. Настоящий стандарт может быть использован контролирующими организациями с целью подтверждения всех форм соответствия набора установленным требованиям, а также при заключении договоров на поставку потребителям.

1.4 Настоящий стандарт организации распространяется только с разрешения НАО «Костанайский региональный университет имени А.Байтурсынова».

Глава 2. Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие нормативно-технические документы:

1) Технический регламент «Требования к безопасности лекарственных средств и биологических препаратов, используемых в ветеринарии», утвержденный Постановлением Правительства Республики Казахстан от 23 апреля 2008 года № 380;

2) Технический регламент «Требования к упаковке, маркировке, этикетированию и правильному их нанесению», утвержденный Постановлением Правительства Республики Казахстан от 21 марта 2008 года № 277);

3) СТ РК 3.1-2001 Государственная система сертификации Республики Казахстан. Знак соответствия. Технические требования;

4) СТ РК 1174-2003 Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание;

5) ГОСТ ИСО/МЭК 17025—2009 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий;

6) ГОСТ 8.579-2002 Государственная система обеспечения единства измерений. Требования к количеству фасованных товаров в упаковках любого вида при их производстве, расфасовке, продаже и импорте;

7) ГОСТ 12.0.004-90 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Организация обучения безопасности труда. Общие положения;

8) ГОСТ 12.1.004-91 ССБТ Пожарная безопасность. Общие требования;

- 9) ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны;
- 10) ГОСТ 12.1.008-76 ССБТ Биологическая безопасность. Общие требования;
- 11) ГОСТ 12.1.044-89 ССБТ Пожара-взрывоопасность веществ и материалов. Номенклатура показателей и методы их определения;
- 12) ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности;
- 13) ГОСТ 12.4.011-89 ССБТ Средства защиты работающих. Общие технические условия;
- 14) ГОСТ 17.0.0.01-76 Система стандартов в области охраны природы и улучшения использования природных ресурсов. Основные положения;
- 15) ГОСТ 1770-74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия;
- 16) ГОСТ 12301-2006 Коробки из картона, бумаги и комбинированных материалов. Общие технические условия;
- 17) ГОСТ 18481-81 Ареометры и цилиндры стеклянные. Технические условия.
- 18) ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия;
- 19) ГОСТ 14192-96 Маркировка грузов;
- 20) ГОСТ 18251-87 Лента клеевая на бумажной основе. Технические условия;
- 21) ГОСТ 5962-67 Спирт этиловый ректификованный. Технические условия;
- 22) ГОСТ 24297-87 Входной контроль продукции. Основные положения;
- 23) ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры;
- 24) ГОСТ 26668-85 Методы отбора проб для микробиологических анализов;
- 25) ГОСТ Р ИСО 7218-2008 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям;
- 26) ГОСТ 12.0.004-90 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Организация обучения безопасности труда. Общие положения.

Примечание - При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов по ежегодно издаваемому информационному указателю «Нормативные документы по стандартизации» состоянию на текущий год и соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменён (изменён, дополнен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменённым (изменённым или дополненным) документом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

Глава 3. Определения

3.1 В настоящем стандарте применяются следующие термины и определения:

- 1) Нуклеиновые кислоты – макромолекулы, являющиеся носителем генетической информации, или выступающие в качестве посредника при синтезе полипептидной цепи;

- 2) Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) – полимер дезоксирибонуклеотидов, существующий в двух цепочечной (дцДНК) или одно цепочечной (оцДНК) форме;
- 3) Матрица (материал) пробы – представленные на испытания продукты, которые могут иметь различия в химическом составе и физическом состоянии;
- 4) Обнаружение – определение наличия целевых фрагментов нуклеиновых кислот патогенных микроорганизмов;
- 5) Предел обнаружения – минимальное количество или концентрация целевого организма в заданном количестве определенной матрицы, которое может быть достоверно обнаружено в условиях, заданных в применяемом методе;
- 6) Идентификация – процесс определения принадлежности изолята патогенного микроорганизма к одному из заданных таксонов;
- 7) Выделение ДНК – обработка пробы, высвобождающая целевые нуклеиновые кислоты;
- 8) ДНК ПЦР-качества – матрица ДНК, длина и количество которой достаточны для ПЦР;
- 9) Дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (dNTP) – раствор, содержащий дезоксиаденозин-трифосфат (дАТФ), дезоксицитозинтрифосфат (дЦТФ), дезоксигуанидинтрифосфат (дГТФ), дезокситимидинтрифосфат (дТТФ) или дезоксиуридинтрифосфат (дУТФ);
- 10) Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – ферментативная реакция, позволяющая амплифицировать ДНК *in vitro*;
- 11) ПЦР продукт – фрагмент ДНК амплифицированный в ПЦР;
- 12) Обнаружение ПЦР-продукта – процесс, показывающий наличие ПЦР-продукта;
- 13) Подтверждение ПЦР-продукта – процесс, который показывает, что ПЦР-продукт получен из целевой последовательности;
- 14) ПЦР с горячим стартом – активация термостабильной ДНК-полимеразы с помощью этапа прогрева перед основной программой: позволяет избежать неспецифической амплификации;
- 15) Праймер – олигонуклеотид с определенной длиной и последовательностью, комплементарный фрагменту аналитически значимой последовательности ДНК;
- 16) Целевая ДНК – выбранная для амплификации последовательность ДНК;
- 17) Денатурация ДНК – процесс, в результате которого двух цепочечная ДНК разделяется на одно цепочечные;
- 18) Отжиг – гибридизация праймера с комплементарной последовательностью нуклеиновых кислот в заданных условиях;
- 19) Элонгация праймера – ферментативная реакция, приводящая к синтезу новой цепи ДНК путем добавления одиночных дезоксирибонуклеотидов к 3'-концу праймера;
- 20) ДНК-полимераза для ПЦР – термостабильный фермент, катализирующий циклический синтез ДНК;

21) Мастер микс – смесь реагентов, необходимых для ПЦР, за исключением целевой ДНК и контролей;

22) Амплификатор - автоматический прибор, выполняющий необходимые для ПЦР циклы нагрева и охлаждения с заданными условиями;

23) Анализ по конечной точке – качественный анализ для обнаружения ПЦР-продуктов;

24) Отрицательный контроль выделения (контроль чистоты выделения) – контроль, прошедший все этапы выделения ДНК, но в отсутствие анализируемой пробы;

25) Положительный контроль ПЦР – реакционная смесь, содержащая определенную массу целевой ДНК или число ее копий;

26) Отрицательный контроль ПЦР – реакционная смесь с не содержащей ДНК водой и без каких-либо ингибиторов ПЦР;

27) Специфичность – способность применяемого метода распознавать исключительно целевую последовательность и отличать ее от сходных последовательностей и загрязняющих примесей;

28) чувствительность – доля истинных положительных случаев, которые были правильно идентифицированы тестом.

Глава 4. Обозначения и сокращения

4.1 В настоящем стандарте применяются следующие сокращения:

- 1) СО – стандарт организации;
- 2) НАО КРУ имени А.Байтурсынова – Некоммерческое акционерное общество «Костанайский региональный университет имени А.Байтурсынова»;
- 3) НИИ ПБ – научно исследовательский институт прикладной биотехнологии;
- 4) ИЦ – испытательный центр;
- 5) ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- 6) ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- 7) dNTP – дезоксирибонуклеотидтрифосфаты;
- 8) дАТФ – дезоксиаденозин-трифосфат;
- 9) дЦТФ – дезоксицитозинтрифосфат;
- 10) дГТФ – дезоксигуанидинтрифосфат;
- 11) дТТФ – дезокситимидинтрифосфат;
- 12) дУТФ – дезоксиуридинтрифосфат.

Глава 5. Ответственность и полномочия

5.1 Утверждает настоящий СО Председатель Правления-ректор КРУ имени А.Байтурсынова.

5.2 Ответственность за внедрение требований, указанных в настоящем СО, несут директор НИИ ПБ.

5.3 Руководителем процессов разработки, оформления, согласования соответствующих документов является заведующий ИЦ НИИ ПБ, который несет ответственность за выполнение требований настоящего СО.

Глава 6. Технические (технологические) требования к набору

6.1 Набор должен соответствовать требованиям настоящего стандарта организации и изготавливаться согласно инструкции по изготовлению набора, утвержденной в установленном порядке.

6.2 В основе диагностической методологии набора заложен метод выявления специфических фрагментов ДНК для *S. aureus*: участок гена термостабильной нуклеазы (*nuc*), гены резистентности к антибиотикам группы бета-лактамов (*BlaZ*), макролидов (*ermC*) и тетрациклинов (*TetK*); для *Str. agalactiae*: участок гена кодирующий глюкокиназу (*Glck*), гены резистентности к антибиотикам группы бета-лактамов (*pbp*), макролидов (*Erm*) и тетрациклинов (*tetM*), путем накопления (амплификации) копий данных фрагментов (ДНК-мишени) в процессе синтеза новых цепей ДНК.

Процесс амплификации основан на многократном увеличении числа копий фрагмента нуклеиновых кислот ДНК с использованием меченых флуоресцентными красителями олиго-нуклеотидных зондов, что позволяет обнаружить специфичный участок генома возбудителя с целью его идентификации в режиме «реального времени».

6.3 Набор состоит из комплекта реагентов для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени.

6.3.1 В состав набора, рассчитанного на проведение 100 анализов, включая контрольные образцы, входят два комплекта: комплект реагентов 1 – для выделения ДНК из клинического материала; комплект реагентов 2 – для амплификации ДНК микроорганизмов рода *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae*

Комплект реагентов 1 состоит из следующих компонентов:

Буфер для лизиса	1 флакон, 50 мл.
Связывающий раствор	1 флакон, 20 мл.
Промывочный раствор 1	1 флакон, 20 мл.
Промывочный раствор 2	1 флакон, 20 мл.
Буфер для элюирования	1 флакон, 10 мл.

Комплект реагентов рассчитан на экстракцию ДНК из 100 проб.

Комплект реагентов 2 состоит из следующих компонентов:

2x Мастер микс	1 пробирка – 1000 мкл.
Тақ ДНК-полимераза	1 пробирка – 200 мкл.
Смесь праймеров <i>S. aureus</i>	1 пробирка – 400 мкл.
Смесь праймеров <i>Str. agalactiae</i>	1 пробирка – 400 мкл.
ПКО <i>S. aureus</i>	1 пробирка – 400 мкл.

ПКО *Str. agalactiae*

1 пробирка – 400 мкл.

ОКО

1 пробирка – 800 мкл.

Комплект реагентов рассчитан на постановку 100 реакций амплификации, включая контроли с детекцией в режиме реального времени.

6.4 Компоненты наборов по своим физико-химическим свойствам должны соответствовать требованиям и нормам, указанным в таблицах 1,2.

Таблица 1 – Требования к компонентам набора комплекта 1

Наименование показателей	Характеристика и норма				Метод контроля
	Лизирующий буфер	Связывающий раствор	Промывочный раствор 1, 2	Буфер для элюирования	
Внешний вид (цвет, консистенция)	Прозрачная бесцветная жидкость	Прозрачная бесцветная жидкость	Прозрачная бесцветная жидкость	Прозрачная бесцветная жидкость	13.2 п. 1
Лекарственная форма	Жидкость	Жидкость	Жидкость	Жидкость	13.2 п. 1
Форма фасовки/разлива	1 флакон, 50 мл	1 флакон, 20 мл.	1 флакон, 20 мл.	1 флакон, 10 мл.	13.2 п. 1
Наличие посторонних примесей, плесени	Не допускается				13.2 п. 2
Нарушение целостности упаковки и укупорки	Не допускается				13.2 п. 1
Показатель водородных ионов	Не нормируется				13.2 п. 3

Таблица 2 – Требования к компонентам набора комплекта 2

Наименование показателей	Характеристика и норма					Метод контроля
	Смесь праймеров	2x Мастер микс	ПКО	ОК	Тақ ДНК-полимераза	
Внешний вид (цвет, консистенция)	Прозрачная зеленая жидкость	Прозрачная бесцветная жидкость				13.2 п. 1
Лекарственная форма	Жидкость					13.2 п. 1
Форма фасовки/разлива	1 пробирка – 1000 мкл.	2 пробирки – по 400 мкл.	По 1 пробирке-400 мкл	1 пробирка – 200 мкл.		13.2 п. 1
Наличие посторонних примесей, плесени	Не допускается					13.2 п. 2

Нарушение целостности упаковки и укупорки	Не допускается	13.2 п. 1
Показатель водородных ионов	Не нормируется	13.2 п. 3

Глава 7. Биологические (биохимические, биофизические) требования

Набор по своим биологическим свойствам должен соответствовать требованиям и нормам, указанным в таблице 3.

Таблица 3 – Требования к набору

Наименование показателей	Характеристика и норма	Метод контроля
Чувствительность	Не менее 10 геном эквивалентов	13.3-13.6
Специфичность	Не должна выявлять ДНК других видов бактерий	13.3-13.6
Срок годности	Срок годности набора -12 месяцев со дня изготовления. Комплект 1- допускается хранение набора при температуре до +25 °С не более 7 суток. Компоненты после вскрытия хранить при +2...8 °С. Комплект 2 – хранить при температуре минус 18 до ...30 °С. Комплект 3- хранить при температуре от 18 до 25 °С в защищённом от света месте	13.7

Глава 8. Требования к сырью и материалам, используемым для контроля набора

8.1 Сырье и материалы, применяемые для изготовления набора, должны соответствовать требованиям Технического регламента «Требования к безопасности лекарственных средств и биологических препаратов, используемых в ветеринарии», действующих нормативных документов на них или, при необходимости, сопровождаться сертификатами соответствия или лабораторными испытаниями изготовителя и должны быть разрешены к применению органами здравоохранения и ветеринарного надзора Республики Казахстан и иметь входной контроль по ГОСТ 24297.

8.2 Входной контроль производится предприятием-изготовителем.

8.3 Сырье и материалы должны соответствовать требованиям стандартов и технических условий, по которым они изготовлены.

8.4 Сырье и материалы должны быть с нормированными физико-химическими и биологическими показателями.

8.5 Данные о качестве и свойствах сырья и материалов должны быть подтверждены документом изготовителя сырья и материалов и соответствующей маркировкой.

8.6 При отсутствии или неполных сведениях в документе или маркировке, изготовитель набора может провести необходимые испытания с оформлением результатов документами, дополняющими (заменяющими) документ на сырье и материалы.

8.7 Сырье и материалы, применяемые для изготовления набора и требования к ним

Комплект реагентов для выделения ДНК должен отвечать следующим требованиям:

Буфер для лизиса должен содержать: 3 М гуанидин тиоцианата, 20 mM этилендиаминтетрауксунной кислоты (EDTA), 10 mM трис-гидрохлорид (Tris-HCl) (pH 6.8), 40 мг/мл Тритон X-100, 10 мг/мл DL-дитиотреитол;

Связывающий раствор должен содержать: 40 мг/мл диоксида кремния (silica, Sigma Aldrich, Милан, Италия), суспендированного в лизирующем буфере;

Промывочный раствор №1 должен содержать: 25% абсолютный этанол, 25% изопропанол, 100 mM NaCl, 10 mM Трис-HCl, pH 8;

Промывочный раствор №2 должен содержать: раствор абсолютного этанола;

Буфер для элюирования должен содержать: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA.

Реакционная смесь для проведения ПЦР должен отвечать следующим требованиям: 3 mM Mg²⁺, 0,2 mM dNTP, 1x Taq ДНК полимеразы, 1x Taq буфера, смесь праймеров 400 nM/l и зондов 200 nM/l для каждого гена.

Для приготовления реакционной смеси используем:

1) 2xqPCRmix, в который входят все необходимые компоненты ПЦР: смесь нуклеотидтрифосфатов; Mg²⁺; ПЦР буфер.

2) Высокопроцессивная Taq ДНК полимеразы со специфическими моноклональными антителами. Свойства полимеразы: 5'→3' полимеразная активность; 5'→3' экзонуклеазная активность; быстрый горячий старт в первом цикле денатурации (95°C, 5-10 сек).

Глава 9. Требования к упаковке и маркировке

9.1 Применяемые виды тары должны соответствовать Техническим регламентам «Требования к безопасности лекарственных средств и биологических препаратов, используемых в ветеринарии», «Требования к упаковке, маркировке, этикетированию и правильному их нанесению», ГОСТ 17768-90 и других нормативных документов, в соответствии с которыми они изготовлены, и допущены к применению, договоров-контрактов на импортную продукцию, принятых (подписанных) в установленном порядке.

9.2 Компоненты наборов фасуют во флаконы и пробирки с завинчивающимися крышками:

1) Буфер для лизиса – 1 флакон, 50 мл. (Флакон 50 мл круглый ФЛКР-050);

- 2) Связывающий раствор – 1 флакон, 20 мл. (Флакон 20 мл круглый ФЛКР-020);
- 3) Промывочный раствор 1,2 – 1 флакон, 20 мл. (Флакон 20 мл круглый ФЛКР-020);
- 4) Буфер для элюирования – 1 флакон, 10 мл. (Флакон 10 мл круглый ФЛКР-010);
- 5) ОКО – 800 мкл в пластиковой пробирке на 2,0 мл («Ахуген» США, кат. № ST 200), с завинчивающейся крышкой («Ахуген» США, кат. № SCO-LP-Y 200);
- 6) 2x Мастер микс – 1000 мкл в пробирках на 2,0 мл («Ахуген» США, кат. № ST 200), с завинчивающейся крышкой («Ахуген» США, кат. № SCO-LP-Y 200);
- 7) Смесь праймеров – 400 мкл в пробирках на 2,0 мл («Ахуген» США, кат. № ST 200), с завинчивающейся крышкой («Ахуген» США, кат. № SCO-LP-Y 200);
- 8) ПКО – 400 мкл в пробирках на 2,0 мл («Ахуген» США, кат. № ST 200), с завинчивающейся крышкой («Ахуген» США, кат. № SCO-LP-Y 200);
- 9) ОК – 800 мкл в пластиковой пробирке на 2,0 мл («Ахуген» США, кат. № ST 200), с завинчивающейся крышкой («Ахуген» США, кат. № SCO-LP-Y 200);

9.3 Объем содержимого раствора в пробирках должен соответствовать номинальному объему, указанному в маркировке. Допускаемые отклонения от объема в меньшую сторону определяются с учетом положений ГОСТ 8.579, отклонения в большую сторону – не ограничиваются.

Комплекты набора упаковывают в отдельные запаиваемые пакеты из полиэтилена по ГОСТ 10354. На каждый пакет наклеивают (или вкладывают) этикетку с указанием наименования комплекта, перечня компонентов, входящих в комплект, количество пробирок каждого компонента и количество препарата в каждой пробирке, номера серии комплекта, условия хранения, даты изготовления, срока годности. Набор должен быть упакован в картонную коробку по ГОСТ 12301 (пакет из полиэтилена). На каждую упаковку набора наклеивают (или вкладывают) этикетку, на которой указывают: наименование организации-производителя, его местонахождение (юридический адрес), товарный знак организации-производителя (при наличии), полное наименование набора, номер серии, номер контроля, дату изготовления, срок годности, условия хранения, обозначение настоящего СТ, надпись «Для животных» или «Для ветеринарного пользования». В каждую упаковку вкладывают инструкцию по применению набора (на государственном и русском языках).

9.4 Наборы должны быть упакованы в транспортную тару – в пенопластовые коробки с хладоэлементами. Транспортная тара должна быть прочной, чистой, сухой, без посторонних запахов.

Пенопластиковая коробка должна быть оклеена лентой с липким слоем по ГОСТ 18251 марки Б или В. По договоренности с потребителем возможны другие формы упаковки. Внутри каждой коробки вкладывают контрольный лист с указанием наименования набора, его количества в коробке, даты упаковки, номера упаковщика.

9.5 Транспортная маркировка по ГОСТ 14192 с указанием манипуляционных знаков: «Беречь от влаги», «Беречь от солнечных лучей», «Ограничение температуры от минус 4 °С до минус 8 °С» (для комплекта 1), «Ограничение тем-

пературы от минус 18 °С до минус 30 °С» (для комплекта 2) и предупредительную надпись «Биопрепараты».

Маркировка транспортной тары должна содержать следующую информацию:

- 1) наименование предприятия-изготовителя, его местонахождение;
- 2) товарный знак предприятия-изготовителя (при его наличии);
- 3) наименование набора;
- 4) количество наборов в коробке;
- 5) номер серии;
- 6) дата изготовления (месяц, год);
- 7) срок годности (месяц, год);
- 8) масса нетто и брутто;
- 9) условия хранения;
- 10) обозначение настоящего стандарта.

Совмещение транспортной маркировки и маркировки, характеризующей данные об упакованной продукции, на одной стороне транспортной тары не допускается. Вся маркировка и инструкция по применению должны быть выполнены на государственном и русском языках.

Глава 10. Риски, возникающие при использовании набора

10.1 Персонал, занятый в производстве набора, должен соблюдать правила личной гигиены, включая использование специальной одежды и индивидуальных средств защиты по ГОСТ 12.4.011 и пройти обучение безопасным условиям труда в соответствии с ГОСТ 12.0.004.

10.2 Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования.

10.3 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

10.4 Нельзя применять набор, не соответствующий требованиям настоящего стандарта: с нарушенной упаковкой, в пробирках без этикеток, имеющей дополнительные включения, с истекшим сроком годности и хранившейся в несоответствующих условиях.

10.5 Людям с гиперчувствительностью к компонентам набора следует избегать прямого контакта с реагентами. При попадании реагентов на кожу, слизистые оболочки, глаза, необходимо обильно промыть чистой водой.

10.6 Набор необходимо хранить в закрытом, недоступном для животных и людей месте, отдельно от пищевых продуктов и кормов, при температуре указанной на этикетке пакета с набором.

10.7 Для избежание контаминации реагентов или попадания в них ингибиторов, необходимо работать в одноразовых латексных или нитриловых перчатках без талька.

10.8 Все работы, должны выполняться только с использованием одноразовых наконечников с аэрозольным барьером для дозаторов. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для

обеззараживания биоматериалов (например, 0,2% раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты).

10.9 Перед началом работы ознакомьтесь с пользовательскими инструкциями на все используемое оборудование и комплекты реагентов.

10.10 Для снижения риска контаминации следует использовать два набора дозаторов: для работы с клиническими образцами; для внесения реагентов.

10.11 Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое. Сотрудники, работающие в помещении для детекции продуктов амплификации (зона 3), не должны посещать помещения для обработки клинического материала (зона 1) и проведения ПЦР (зона 2). Смена верхней одежды, головных уборов, обуви и перчаток является обязательным условием при выходе из помещения для электрофоретического анализа.

10.12 Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, должны обязательно до начала и после окончания работ облучаться ультрафиолетовым светом.

10.13 Обеззараживание биоматериалов и реагентов проводят для каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду на 20-24 часа в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания биоматериалов (например, 0,2% раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты).

10.14 При работе с включённым трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или защитной маской, так как ультрафиолетовый свет вызывает ожоги лица и слизистой глаз.

10.15 Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб клинического материала осуществляется в строгом соответствии с требованиями СП РК № 684 «Санитарно-эпидемиологические требования к хранению, и транспортировке материалов (микроорганизмов)».

10.16 ПЦР анализ проводится в три этапа в трех отдельных помещениях (зонах), согласно СП РК № 684 «Санитарно-эпидемиологические требования к условиям работы в микробиологических лабораториях».

Глава 11. Требования к безопасности и охране окружающей среды

11.1 Требования безопасности, производственной санитарии, санитарно-противоэпидемического режима выполняют в соответствии с правилами техники безопасности, производственной санитарии и санитарно-противоэпидемического режима для предприятий по производству препаратов, утверждёнными министерством здравоохранения Республики Казахстан. Они должны соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.008.

11.2 Набор должен быть безопасен для персонала, допущенного в установленном порядке к ее производству, а также для окружающей среды.

11.3 Утилизация набора с истекшим сроком годности, серий, не выдержавших контрольных испытаний, а также после использования, не требует специальных мер безопасности.

11.4 Помещения, в которых проводятся работы с сырьем для производства набора, должны быть оборудованы общей приточно-вытяжной местной вентиляцией, обеспечивающей состояние воздушной среды в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005.

11.5 Пожарную безопасность на предприятии и рабочих местах, а также организационно-технические мероприятия по обеспечению пожарной безопасности следует обеспечивать в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.004, ГОСТ 12.1.044.

Глава 12. Правила приёмки

12.1 Каждая серия набора должна быть принята (проверена) на предприятии - изготовителе.

12.2 Набор принимают сериями. Под серией следует считать определенное количество наборов, произведенных в одном технологическом цикле (от входного контроля сырья до упаковки и маркировки готовой продукции включительно) изготовленное в одних производственных условиях, получившее свой номер, номер контроля и оформленное одним документом о качестве, содержащем:

1) Наименование и местонахождение предприятия-изготовителя (юридический адрес, включая страну) и организации в Республике Казахстан, уполномоченной изготовителем на принятие претензий от потребителей на ее территории (при наличии);

2) Наименование набора;

3) Состав набора;

4) Номер серии;

5) Количество наборов в серии;

6) Номер контроля;

7) Описание компонентов и соответствие описанию настоящему стандарту;

8) Номер и дата выдачи документа о качестве;

9) Результаты контроля чувствительности и специфичности (протокол);

10) Дату изготовления и выпуска серии набора (месяц, год);

11) Срок годности (месяц, год);

12) Условия хранения;

13) Обозначение настоящего стандарта организации;

14) Заключение и подпись лица, выдавшего документ о качестве.

Каждая серия набора предъявляется для приемки по завершении технологического цикла ее производства.

9.3 Набор следует подвергать следующим видам испытаний:

1) Приемо-сдаточным;

2) Периодическим;

3) По подтверждению соответствия (добровольный тип);

4) Государственному контролю качества.

12.4 Предприятие-изготовитель должно контролировать качество упаковки, маркировки, комплектность поставки, а также соответствие показателей качества набора требованиям настоящего стандарта.

12.5 Для проверки качества набора из разных мест серии отбирают 4 упаковки набора, из которых 2 набора используют для испытания на показатели качества, а остальные 2 набора хранят в архиве контролёра в течение срока годности.

12.6 При получении неудовлетворительных результатов контроля, хотя бы по одному из показателей, по нему проводят повторный контроль по всем показателям на удвоенном количестве образцов (пробирок), отобранных от той же серии набора. Результаты повторного испытания распространяются на всю серию и считаются окончательными. В случае неудовлетворительных результатов повторной проверки, серию считают несоответствующей требованиям настоящего стандарта организации, выбраковывают и уничтожают путём автоклавирования (2 часа при температуре 134°C).

12.7 Контрольная проверка образцов, поступивших с рекламациями, проводится на предприятии-изготовителе или в аттестованной лаборатории.

12.8 Документ о качестве на серию должен входить в комплект сопроводительной документации на продукцию. Число экземпляров (копий) документа о качестве каждой серии, входящих в комплект сопроводительной документации, должно быть определено в договоре на поставку продукции.

12.9 Контроль качества серии готового набора осуществляет предприятие-изготовитель. На государственный контроль, предприятие отправляет необходимое для полного контроля количество наборов в соответствии с требованиями контролирующей организации.

12.10 Испытания с целью подтверждения соответствия должны проводиться на добровольной основе по заявленным показателям (изготовителя, продавца, исполнителя), в целях соответствия с требованиями нормативных документов, определенных заявителем, в соответствии с требованиями Государственной системы технического регулирования Республики Казахстан.

Глава 13. Методы контроля

13.1 Метод отбора проб

1) Из выборки отбирают 4 набора методом случайного отбора, две из которых используют для проведения испытания, а два направляют в архив контролёра предприятия-изготовителя для сохранения на протяжении 1 года.

2) Образцы набора, отправленные в архив, маркируют надписью «Архив» хранят в сухом, защищенном от света и осадков месте, в течение срока годности, 1 комплект реагентов при температуре +2...8 °С., 2 комплект реагентов при температуре минус -18 ... -30 °С, 3 комплект реагентов при комнатной температуре.

3) Образцы препарата, направленные в архив (арбитражные пробы) снабжают документом установленной формы с указанием: наименования предприятия-изготовителя, его местонахождения (пункт, область), наименования препарата, даты изготовления, срока годности, номера серии, номера контроля, количества доз в пробирке, условий хранения, даты отбора пробы, общего количества единиц

упаковки, объема серии, должности и подписи лица, отобравшего пробу, обозначения настоящего стандарта.

13.2 Определение внешнего вида, цвета проводят визуально.

1) По внешнему виду набор представляет собой:

– комплект реагентов 1: лизирующий буфер, Связывающий раствор, Промывочный раствор 1, Промывочный раствор 2, Буфер для элюирования - прозрачная бесцветная жидкость;

– комплект реагентов 2: 2x Мастер микс, Таq ДНК-полимераза, ПКО *S. aureus* и *Str. agalactiae*, ОКО - прозрачная жидкость, Смесь праймеров - прозрачная зеленоватая жидкость;

Для определения внешнего вида, цвета, каждую пробирку с раствором встряхивают и просматривают в проходящем свете, переворачивая вниз крышкой. Одновременно все пробирки (флаконы) проверяют на плотность закрытия и правильность маркировки. При неполном закрытии, а также при наличии трещин пробирок (флаконов) и отсутствии этикеток набор подлежит выбраковке.

2) Наличие посторонней примеси, плесени

Для определения наличия посторонней примеси, плесени, хлопьев и осадка, пробирки с реагентами, предназначенные для контроля, просматривают, как указано в п. 13.2 п. 1. В пробирках (флаконах) с набором не должно содержаться посторонней примеси, плесени.

3) Концентрация водородных ионов (рН) не нормируется.

13.3 Определение чувствительности и специфичности набора

Для определения аналитической чувствительности тестовых праймеров и зондов к выбранным целевым участкам генов – пус для *Staphylococcus aureus*, Glck для *Streptococcus agalactiae*, производим последовательные разведения выделенной ДНК, рассчитывая процент геномов от -1 до -9 степени.

Для определения диагностической специфичности тестируемых участков генов пус и Glck, проводят путем анализа *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* и другого вида бактерий

13.4 ПЦР анализ проводят в три этапа в отдельных помещениях (зонах).

Аппаратура, материалы и реактивы

1) Для выделения ДНК из испытуемого материала – ЗОНА 1:

– стерильный ламинарный бокс (класс биологической безопасности II тип А);

– твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» 1,5 мл, поддерживающий температуру на 25-100 °С;

– микроцентрифуга для микропробирок типа «Эппендорф» со скоростью вращения до 14 тыс. об/мин;

– центрифуга/вортекс с максимальной скоростью вращения 2400 об/мин;

– холодильник бытовой от 2°С до 8 °С с морозильной камерой

– отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки;

– емкость с дезинфицирующим средством для сброса наконечников;

– штативы для наконечников (например, «Ахуген» США) и микропробирок на 1,5 мл;

– одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5 мл;

– набор электронных или механических дозаторов переменного объема;

– одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 100 мкл, до 200 и до 1000 мкл (например, «Ахуген» США).

2) Для проведения амплификации (ПЦР) требуется – ЗОНА 2:

– ПЦР – бокс с бактерицидной лампой;

– амплификатор для работы в режиме Real-time (Applied Biosystems QuantStudio 5);

– вортекс;

– набор механических дозаторов переменного объема;

– одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген» США);

– штативы для наконечников и микропробирок объемом 0,2 мл;

13.5 Проведение испытаний

Выращивают суточные агаровые культуры, выбранных для испытания микроорганизмов по общепринятым для них методикам.

1) ЭТАП 1 (зона №1). Выделение ДНК из исследуемого материала.

Извлечь набор из холодильника, открыть упаковку, извлечь лизирующий буфер и ОКО, выдержать при комнатной температуре в течение 15 мин.

– Разведите 500 мкл. образца молока 500 мкл. стерилизованного физиологического раствора (NaCl 0,9%) и центрифугируйте 1 мин. при 13000 об/мин.; отбросьте супернатант.

– Добавьте 300 мкл. лизирующего буфера и 200 мкл. связывающего раствора к осадку, ресуспендированному в 50 мкл физиологического раствора. Перемешать и инкубировать 5 мин при температуре 65⁰С. Центрифугируйте в течение 1 мин. при 13000 об/мин.; отбросьте супернатант.

– Добавьте 200 мкл. промывочного раствора 1 и встряхните пробирку на вортексе. Центрифугируйте в течение 1 мин. при 13000 об/мин.; отбросьте супернатант.

– Добавьте 200 мкл. промывочного раствора 2 и встряхните пробирку на вортексе. Центрифугируйте в течение 1 мин. при 13000 об/мин.; отбросьте супернатант. Высушите пробирки с открытыми крышками при 37⁰С в течение 10 минут.

– Добавьте 100 мкл. элюирующего буфера, встряхните пробирку на вортексе и инкубируйте в течение 15 мин при 65⁰С. Центрифугируйте в течение 2 мин. при 13000 об/мин.

Надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, готова к внесению в реакционную смесь для ПЦР-амплификации.

Если образец предполагается хранить, перенесите надосадочную жидкость в новую пробирку.

2) Определение аналитической чувствительности

Для определения аналитической чувствительности тестовых праймеров и зондов к выбранным целевым участкам генов – nuc для *S. aureus*, glck для *Str.*

agalactiae, производим последовательные разведения ДНК от -1 до -9 степени рассчитав процент геномов, с последующей постановкой ПЦР.

Число геномных копий вычисляют по формуле:

Количество геномных копий = (кол-во ДНК (нг/мкл) * 6 x10²³) / (2x10⁹),

где 6 x10²³ – число Авогадро

2x10⁹ = 3,3 x10⁶ x 300 г/моль x 2 = 2 x 10 x 10⁸ = 2x10⁹

где 3,3 x10⁶ – бактериальный геном

300 г/моль – средняя масса основания

2 – количество пар

Концентрацию ДНК контрольных штаммов определяют спектрофотометрически.

Чувствительность - набор должен выявлять ДНК бактерий рода *S. aureus*, и *Str. agalactiae*, находящихся в пробе, в количестве не менее 10 геном эквивалентов в 1 мкл.

Специфичность – набор не должен амплифицировать ДНК других видов бактерий.

Таблица 4 – Пример расчета ДНК, копий/мкл *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae*

Источник ДНК		<i>S.aureus</i>	<i>Str.agalactiae</i>
Длина ДНК, п.о.		2821361	2074179
Спектрофотометрия нг/мкл		38,72	27,61
Моль/мкл		2,0794E-17	2,0169E-17
Копий /мкл		12 522 287,14298	12 145 828,42802
Разведения	-1	1 252 229	1 214 583
	-2	125 223	121 458
	-3	12 522	12 146
	-4	1 252	1 215
	-5	125	121
	-6	13	12
	-7	1	1
	-8	0	0
	-9	0	0

3) ЭТАП 2 (зона №2). Постановка ПЦР – амплификации участка ДНК

– Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать (перевернув пробирки несколько раз) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

– В пробирке объемом 1,5 мл приготовить «Мастер Микс»: из расчета на N выделений смешать 10*(N+1) мкл 2x Мастер микса, 2*(N+1) мкл Taq ДНК-полимеразы и 4*(N+1) мкл праймеров, аккуратно перемешать, разнести по 16 мкл в пробирки для проведения ПЦР.

СО 034-2023

– Используя наконечник с фильтром добавить по 4 мкл ДНК исследуемых образцов, а также отрицательный и положительный контроли амплификации (ОКО и ПКО соответственно). Герметично закрыть пробирки крышками. Перемешать, осадить кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации:

- Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор;
- В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор.

Таблица 5 – Подготовка ПЦР-смеси

Компонент	Объем, мкл
Смесь праймеров	4
2x Мастер микс	10
Taq ДНК-полимераза	2
Исследуемый образец	4
Суммарный объем реакции	20

Таблица 6 – Параметры амплификации

№ блока	t° С	Время		Число циклов	Режим оптических измерений
		мин	сек		
1	95	5	0	1	
2	94	0	10	40	FAM, JOE, ROX, TAMRA
	60	0	20		

4) Интерпретация результатов амплификации

Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Сt» в соответствующей графе в таблице результатов).

Анализ оптических измерений:

Staphylococcus aureus:

- специфический ген термостабильной нуклеазы (nuc) – канал FAM;
- ген резистентности к антибиотикам группы бета-лактамов (BlaZ) – канал JOE;
- ген резистентности к антибиотикам группы макролидов (ermC) – канал ROX;
- ген резистентности к антибиотикам группы тетрациклинов (TetK) – канал TAMRA.

Streptococcus agalactiae:

- специфический ген глюкокиназы (Glck) – канал FAM;
- ген резистентности к антибиотикам группы бета-лактамов (pbp) – канал JOE;
- ген резистентности к антибиотикам группы макролидов (Erm) – канал ROX;
- ген резистентности к антибиотикам группы тетрациклинов (tetM) – канал TAMRA.

Таблица 7 – Интерпретация результатов

Результат образца	Значение «Ct» по каналу «FAM, JOE, ROX, TAMRA»
Положительный	+ (Ct≤24)
Сомнительный	+ (Ct>24)
Отрицательный	–

В случае сомнительного образца (Ct > 24) требуется повторно провести ПЦР исследование соответствующего образца, начиная с этапа выделения ДНК. Требуется параллельно провести исследование смывов с поверхностей в лаборатории для исключения внутрилабораторной контаминации. В случае повторного получения положительного результата по каналу «FAM, JOE, ROX, TAMRA» и отрицательного результата исследования смывов, образец считать положительным.

Результаты анализа не подлежат учету в случаях, если результаты анализа контрольных точек не совпадают с приведёнными в таблице 7, то соответствующий этап анализа следует переделать.

5) Определение срока годности набора

Срок годности набора определяют через 12 месяцев (Приложение А), путем определения ее чувствительности по п. 13.5.2, при хранении комплекта 1 при температуре +2 8 °С, комплекта 2 от минус 18°С до 30°С в защищённом от света месте.

Через год хранения набор должен выявлять ДНК в количестве не менее 10 геном эквивалентов.

Глава 14. Транспортировка и хранение

Набор транспортируют в закрытых транспортных средствах всеми видами транспорта в соответствии с ГОСТ 17768 и правилами перевозки скоропортящихся грузов и багажа, действующими на данном виде транспорта при температуре от минус 18 до минус 30°С (2-го комплекта) не более 5 суток. Допускается транспортировка комплекта 1 при температуре до +25 °С не более 7 суток.

Набор хранят на предприятии-изготовителе и у потребителя в закрытом помещении в темном сухом месте в упаковке изготовителя, при температуре от минус 18 до минус 30°С (2 комплект), относительной влажности не более 75 %, в пределах срока годности, указанного на упаковке. Компонент 1 хранится при +2 8 °С. Комплект 3 хранится при комнатной температуре. Срок годности набора – 12 месяцев с даты изготовления.

Глава 15. Указания к применению

Набор применяют в ветеринарной практике для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности, в соответствии с наставлением по ее применению,

разработанной и утвержденной предприятием-изготовителем в установленном порядке.

Глава 16. Гарантии организации-производителя

Предприятие-изготовитель должно гарантировать соответствие качества набора требованиям настоящего стандарта организации при соблюдении потребителем условий транспортирования, хранения и применения, установленных настоящим стандартом.

Глава 17. Пояснительная записка к техническим условиям

На ветеринарный препарат «Набор для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности»

1. Основание для разработки - бюджетная программа 267 «Повышение доступности знаний и научных исследований» по подпрограмме 101 «Программно-целевое финансирование научных исследований и мероприятий» по теме: ИРН BR10764944 «Разработка методов аналитического контроля и проведения мониторинга безопасности пищевой продукции» на 2021-2023 годы.

2. Цель - Анализ рисков появления устойчивости патогенной микрофлоры к антибиотикам и установление локусов антибиотикорезистентности

3. Характеристика объекта.

4 В разделе «Технические требования», «Биологические требования», «Требования к упаковке и маркировке», содержатся требования к внешнему виду, цвету, наличию посторонних примесей, специфичности, чувствительности, упаковке и маркировке набора. В разделах «Правила приемки» и «Методы контроля» дан основной порядок приемо-сдаточного контроля перечисленных выше показателей качества набора и представлены методы испытания. В разделе «Транспортировка и хранение» регламентируются требования, обеспечивающее качество и сохранность набора при транспортировании и хранении.

1. Предлагаемый срок введения в действие

Набор может быть введен в действие в течение одного месяца после утверждения.

Взаимосвязь с другими стандартами и техническими условиями.

При разработке стандарта авторы руководствовались инструкцией по изготовлению и контролю набора для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и наставлением по ее применению, составленных на основе результатов научных исследований ИЦ НИИ ПБ НАО «Костанайский региональный университет имени А.Байтурсынова».

На разработанный набор проведены комиссионные испытания в ИЦ НИИ ПБ НАО «Костанайский региональный университет имени А.Байтурсынова», производственное испытание в Костанайской НИВС (Приложение Б).

4. Источники информации - Ветеринарное законодательство том 3, стр 29-30.

Глава 18. Порядок внесения изменений

Внесение изменений в настоящий СО осуществляется по инициативе разработчиков, руководителя подразделения, курирующего проректора и производится в соответствии с ДП 082-2022 Документированная процедура. Управление документацией.

Глава 19. Согласование, хранение и рассылка

1) Настоящий СО согласовывается с проректором по исследованиям, инновациям и цифровизации, секретарем ученого совета, начальником управления отдела правового обеспечения и государственных закупок и начальником отдела документационного обеспечения.

2) Рассылку проекта настоящего СО экспертам, указанным в предисловии, осуществляют разработчики.

3) Ответственность за передачу настоящего СО (оригинала) на хранение в ОДО несет разработчик.

4) Оригинал утвержденного настоящего СО вместе с листом согласования хранится в ОДО.

Приложение А
Инструкция по применению

ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

1. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор.
2. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор

Таблица 4 – Параметры амплификации

№ блока	T °С	Время		Число циклов	Режим оптических измерений
		мин	сек		
1	95	5	0	1	
		94	0		
2	60	0	20	40	FAM, JOE, ROX, TAMRA

Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Сt») в соответствующей графе в таблице результатов).

Анализ оптических измерений

Staphylococcus aureus:

- специфический ген термостабильной нуклеазы (*nuc*) – канал FAM;
- ген резистентности к антибиотикам группы бета-лактамов (*blaZ*) – канал JOE;
- ген резистентности к антибиотикам группы макролидов (*ermC*) – канал ROX;
- ген резистентности к антибиотикам группы тетрациклинов (*TetK*) – канал TAMRA.

Streptococcus agalactiae:

- специфический ген глюкозидазы (*Gick*) – канал FAM;
- ген резистентности к антибиотикам группы бета-лактамов (*rbr*) – канал JOE;
- ген резистентности к антибиотикам группы макролидов (*erm*) – канал ROX;
- ген резистентности к антибиотикам группы тетрациклинов (*tetM*) – канал TAMRA.

Таблица 5 – Интерпретация результатов

Результат образца	Значение «Сt» по каналу «FAM, JOE, ROX, TAMRA»
Положительный	+ (Сt<24)
Сомнительный	+ (Сt>24)
Отрицательный	

В случае сомнительного образца (Сt > 24) требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа выделения ДНК. Требуется параллельно провести исследование смывов с поверхностей в лаборатории для исключения внутривлабораторной контаминации. В случае повторного получения положительного результата по каналу «HEX/Yellow» и отрицательного результата исследования смывов, образец считать положительным.

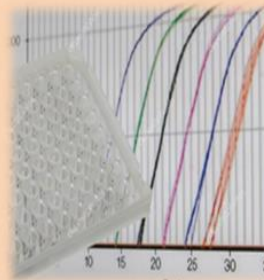
ХРАНЕНИЕ НАБОРА

Набор ПЦР-РВ хранят при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С. Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз. Срок годности тест-системы – 12 месяцев с даты изготовления.

Комплект реагентов для выделения ДНК хранят при температуре +2 – +8 °С.



НАУЧНО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПРИКЛАДНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ



Набор реагентов для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определение локусов антибиотикорезистентности

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набора реагентов для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определение локусов антибиотикорезистентности

Тест-система предназначена для выделения ДНК *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определение локусов антибиотикорезистентности полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ).

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ КОМПЛЕКТ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-РВ

Комплектация тест-системы рассчитана на проведение 100 анализов, включая контроли, и указана в таблице 1.

Таблица 1 – Состав набора ПЦР-РВ

2x Мастер микс	1000 мкл.
Таг ДНК-полимераза	1 пробирка – 200 мкл.
Смесь праймеров <i>S. aureus</i>	1 пробирка – 400 мкл.
Смесь праймеров <i>Str. agalactiae</i>	1 пробирка – 400 мкл.
ПКО <i>S. aureus</i>	1 пробирка – 400 мкл.
ПКО <i>Str. agalactiae</i>	1 пробирка – 400 мкл.
ОКО	1 пробирка – 800 мкл.

Лимит детекции тест-системы составляет не менее 10 геном-эквивалентов возбудителя в реакции ПЦР.

ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Метод обнаружения ДНК возбудителя основан на экстракции общей ДНК из биологического материала и проведении амплификации полученной ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Результат амплификации ДНК возбудителя регистрируется на каналах «FAM, JOE, ROX, TAMRA».

КОМПЛЕКТ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК

предназначен для работы с культурами бактерий, смывами, а также материалом, в котором присутствует значительное количество ингибирующих примесей.

Метод основан на использовании для лизиса клеток сильного хаотропного агента – гуанидина тиоцианата (GuSCN), и последующей сорбции ДНК на носителе (диоксид кремния). Перед началом работы, буфер для лизиса необходимо прогреть в течение 15-20 мин при 50°C.

Таблица 2 – Состав комплекта реагентов для выделения ДНК на 100 реакций

№	Реактив	Состав	Количество, мл.
1	Буфер для лизиса	3М гуанидин тиоцианат, 20 мМ ЭДТА, 10 мМ Трис-HCl (pH 6,8), 40 мг/мл диоксида кремния (Sigma Aldrich, Милан, Италия), сульфидированного в лигандном буфере	50
2	Связывающий раствор	40 мг/мл диоксида кремния (Sigma Aldrich, Милан, Италия), сульфидированного в лигандном буфере	20
3	Промывочный раствор 1	25% абсолютный этанол, 25% изопропанол, 100 мМ NaCl, 10мМ Трис-HCl, pH 8	20
4	Промывочный раствор 2	Раствор абсолютного этанола	20
5	Буфер для элюирования	10 мМ Трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА	10



ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

ПЦР-анализ проводят в два этапа в отдельных помещениях (зонах). Для работы требуются следующие материалы и оборудование:

ЗОНА 1 – Для экстракции ДНК из исследуемого материала.

ЗОНА 2 – Для проведения амплификации ДНК:

- амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени» на каналах FAM, JOE, ROX, TAMRA;
- ПЦР-боксы;
- центрифуга/вortex;
- набор дозаторов переменного объема;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл;
- одноразовые полипропиленовые зажимывающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл;
- оптические пробирки объемом 0,2 мл;
- штативы для пробирок объемом 0,2 мл и 1,5 мл и наконечников;
- холодильник от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой от минус 24 °С до минус 16 °С;
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сброса наконечников;
- комплект средств для обработки рабочего места.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Выделение ДНК

Инструкция по применению комплекта реагентов для выделения ДНК (Таблица 2):

- 1 Разведите 500 мкл. образца молока 500 мкл. стерилизованного физиологического раствора (NaCl 0,9%) и центрифугируйте 1 мин. при 13000 об/мин.; отбросьте супернатант.
- 2 Добавьте 300 мкл. лизирующего буфера и 200 мкл. связывающего раствора к осадку, ресуспендированному в 50 мкл физиологического раствора. Перемешать и инкубировать 5 мин при температуре 65°C. Центрифугируйте в течение 1 мин. при 13000 об/мин.; отбросьте супернатант.
- 3 Добавьте 200 мкл. промывочного раствора 1 и встряхните пробирку на vortexe. Центрифугируйте в течение 1 мин. при 13000 об/мин.; отбросьте супернатант.
- 4 Добавьте 200 мкл. промывочного раствора 2 и встряхните пробирку на vortexe. Центрифугируйте в течение 1 мин. при 13000 об/мин.; отбросьте супернатант. Высушите пробирки с открытыми крышками при 37°C в течение 10 минут.
- 6 Добавьте 100 мкл. элюирующего буфера, встряхните пробирку на vortexe и инкубируйте в течение 15 мин при 65°C. Центрифугируйте в течение 2 мин. при 13000 об/мин.

Надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, готова к использованию в реакционную смесь для ПЦР-амплификации.

Если образец предполагается хранить, перенесите надосадочную жидкость в новую пробирку.

Подготовка ПЦР-смеси (Таблица 1):

1. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать (переворачивая пробирку несколько раз) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.
2. В пробирке объемом 1,5 мл приготовить «Мастер Микс»: из расчета на N выделений смешать 10*(N+1) мкл 2x Мастер микса, 2*(N+1) мкл Таг ДНК-полимеразы и 4*(N+1) мкл праймеров, аккуратно перемешать, развести по 16 мкл в пробирки для проведения ПЦР.
3. Используя наконечник с фильтром добавить по 4 мкл ДНК исследуемых образцов, а также отрицательный и положительный контроль амплификации (ОКО и ПКО соответственно). Герметично закрыть пробирки крышками. Перемешать, осадить кратковременным центрифугированием.

Таблица 3 – Подготовка ПЦР-смеси

Компонент	Объем, мкл
Смесь праймеров	4
2x Мастер микс	10
Таг ДНК-полимераза	2
Исследуемый образец	4
Суммарный объем реакции	20



Акт №1

комиссионных испытаний чувствительности и специфичности мультимплексной полимеразной цепной реакции для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя, доктора ветеринарных наук Мустафина Б.М.; членов – м.в.н. Алиева К.Т., PhD Рыщановой Р.М., к.в.н. Чужебаевой Г.Д., м.в.н. Байменова Б.М. составили настоящий акт о том что 07.04.2023 г. провели лабораторные испытания специфичности полимеразной цепной реакции для выявления *Staphylococcus aureus* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

Испытания проводились в отделе молекулярно-биологических исследований КРУ им. А. Байтурсынова.

Материалы и методы

Для оценки аналитической чувствительности тестовых праймеров и зонда к выбранному целевому участку гена – пус для *Staphylococcus aureus* произвели последовательные разведения выделенной ДНК от 1 252 229 копий ДНК/мкл (-1) до 1 копий ДНК/мкл (-7). Предел обнаружения, представляет собой наименьшее количество анализируемого вещества, которое может быть обнаружено и определено с помощью анализа кривых ПЦР с приемлемым уровнем точности.

Таблица – Расчет ДНК, копий/мкл *Staphylococcus aureus*

Источник ДНК		<i>S.aureus</i>
Длина ДНК, п.о.		2821361
Спектрофотометрия нг/мкл		38,72
Моль/мкл		2,0794E-17
Копий /мкл		12 522 287,14298
Разведения	-1	1 252 229
	-2	125 223
	-3	12 522
	-4	1 252
	-5	125
	-6	13
	-7	1
	-8	0
	-9	0

Для проведения ПЦР использовали реакционную смесь следующего состава: 10X Таq буфер – 2 µl, Mg²⁺ – 2 µl, смесь dNTP – 1 µl, MQ вода – 5 µl, 10X Таq ДНК-полимераза – 2 µl, смесь праймеров – 4 µl, ДНК – 4 µl.

Постановку ПЦР проводили согласно подготовленным рекомендациям по проведению мультиплексной ПЦР для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

При проведении ПЦР использовали следующий протокол выполнения амплификации:

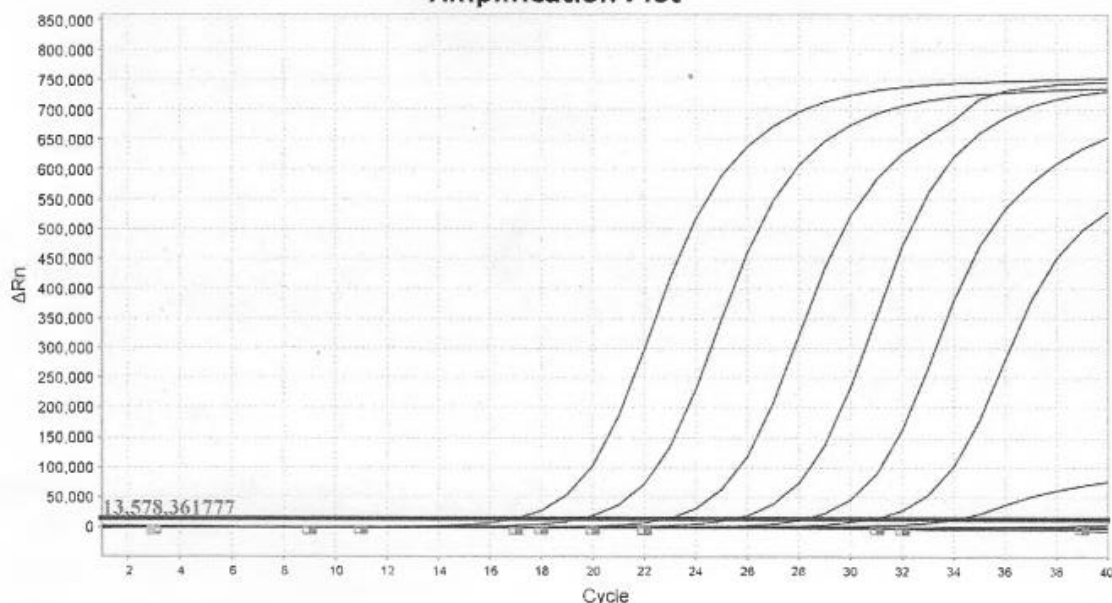
№ блока	t° С	Время		Число циклов	Режим оптических измерений
		мин	сек		
1	95	5	0	1	
2	94	0	10	40	FAM
	60	0	20		

Заключение

Интерпретацию результатов проводили на основании наличия (отсутствия) пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией, что определяло значение порогового цикла (Ct).

Кривые накопления флуоресцентного сигнала наблюдались в диапазонах разведения исследуемой ДНК от -1 до -6 степени, в диапазонах разведения от -7 до -9 степени, флуоресцентный сигнал отсутствовал.

Amplification Plot



Рисунок– Кривые накопления флуоресцентного сигнала последовательных разведений выделенных ДНК копий/мкл *Staphylococcus aureus*

По результатам проведенного эксперимента, диагностическая чувствительность тест системы для целевого гена nuc *Staphylococcus aureus*, составила 13 копий ДНК/мкл.

Члены комиссии:

Заведующий «Костанайская НИВС» филиала
ТОО КазНИВИ - председатель комиссии, д.в.н.
Ветеринарный врач Костанайского ОФ «РВЛ»,
м.с\х. наук

Заведующая ИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, к.в.н.

Заведующая ИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, PhD, профессор

Научный сотрудник НИИ прикладной
биотехнологии КРУ им. А. Байтурсынова, м.в.н.

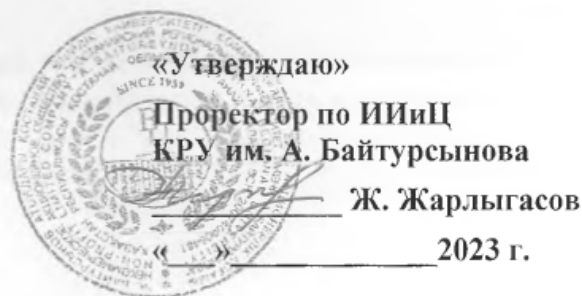
Б. Мустафин

К. Алиев

Г. Чужебаева

Р. Рыцанова

Б. Байменов



Акт №2

комиссионных испытаний чувствительности и специфичности мультиплексной полимеразной цепной реакции для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя, доктора ветеринарных наук Мустафина Б.М.; членов – м.в.н. Алиева К.Т., PhD Рыщановой Р.М., к.в.н. Чужебаевой Г.Д., м.в.н. Байменова Б.М. составили настоящий акт о том что 11.04.2023 г. провели лабораторные испытания специфичности полимеразной цепной реакции для выявления *Staphylococcus aureus* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

Испытания проводились в отделе молекулярно-биологических исследований КРУ им. А. Байтурсынова.

Материалы и методы

Для оценки аналитической чувствительности тестовых праймеров и зонда к выбранному целевому участку гена – Glck для *Streptococcus agalactiae* произвели последовательные разведения выделенной ДНК от 1 214 583 (-1) копий ДНК/мкл до 1 копий ДНК/мкл (-7).

Предел обнаружения, представляет собой наименьшее количество анализируемого вещества, которое может быть обнаружено и определено с помощью анализа кривых ПЦР с приемлемым уровнем точности.

Таблица – Расчет ДНК, копий/мкл *Streptococcus agalactiae*

Источник ДНК	<i>Str. agalactiae</i>	
Длина ДНК, п.о.	2074179	
Спектрофотометрия нг/мкл	27,61	
Моль/мкл	2,0169E-17	
Копий /мкл	12 145 828,42802	
Разведения	-1	1 214 583
	-2	121 458
	-3	12 146
	-4	1 215
	-5	121
	-6	12
	-7	1
	-8	0
-9	0	

Для проведения ПЦР использовали реакционную смесь следующего состава: 10X Taq буфер – 2 µl, Mg²⁺ – 2 µl, смесь dNTP – 1 µl, MQ вода – 5 µl, 10X Taq ДНК-полимераза – 2 µl, смесь праймеров – 4 µl, ДНК – 4 µl.

Постановку ПЦР проводили согласно подготовленным рекомендациям по проведению мультиплексной ПЦР для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

При проведении ПЦР использовали следующий протокол выполнения амплификации:

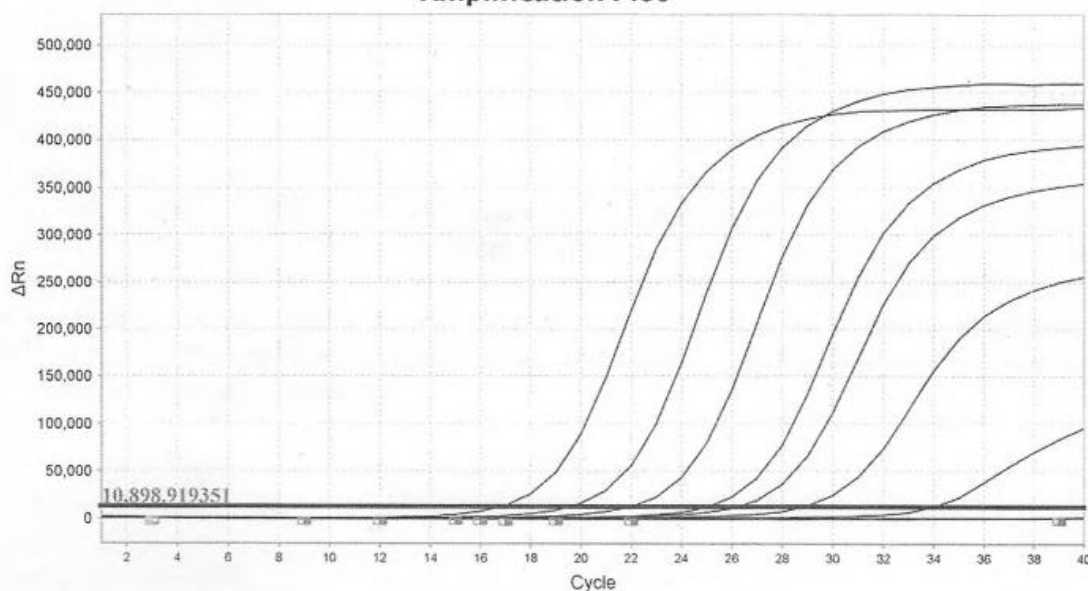
№ блока	t° C	Время мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений
1	95	5	0	1	FAM, JOE, ROX, TAMRA
2	94	0	10	40	
	60	0	20		

Заключение

Интерпретацию результатов проводили на основании наличия (отсутствия) пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией, что определяло значение порогового цикла (Ct).

Кривые накопления флуоресцентного сигнала наблюдались в диапазонах разведения исследуемой ДНК от -1 до -6 степени, в диапазонах разведения от -7 до -9 степени, флуоресцентный сигнал отсутствовал.

Amplification Plot




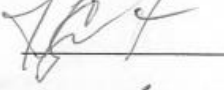
Рисунок– Кривые накопления флуоресцентного сигнала последовательных разведений выделенных ДНК копий/мкл *Streptococcus agalactiae*


По результатам проведенного эксперимента, диагностическая чувствительность тест системы для целевого гена *pus Streptococcus agalactiae*, составила 12 копий ДНК/мкл.

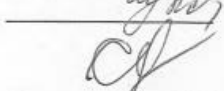
Члены комиссии:


Заведующий «Костанайская НИВС» филиала
ТОО КазНИВИ - председатель комиссии, д.в.н.
Ветеринарный врач Костанайского ОФ «РВЛ»,
м.с\х. наук
Заведующая ИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, к.в.н.
Заведующая НИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, PhD, профессор
Научный сотрудник НИИ прикладной
биотехнологии КРУ им. А. Байтурсынова, м.в.н.



Б. Мустафин


К. Алиев


Г. Чужебаева


Р. Рыщанова


Б. Байменов



«Утверждаю»

Проректор по ИИиЦ

КРУ им. А. Байтурсынова

Ж. Жарлыгасов

2023 г.

Акт №3

комиссионных испытаний чувствительности и специфичности мультиплексной полимеразной цепной реакции для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя, доктора ветеринарных наук Мустафина Б.М.; членов – м.в.н. Алиева К.Т., PhD Рыщановой Р.М., к.в.н. Чужебаевой Г.Д., м.в.н. Байменова Б.М. составили настоящий акт о том что 19.04.2023 г. провели лабораторные испытания специфичности полимеразной цепной реакции для выявления *Staphylococcus aureus* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

Испытания проводились в отделе молекулярно-биологических исследований КРУ им. А. Байтурсынова.

Материалы и методы

Для оценки аналитической чувствительности тестовых праймеров и зонда к выбранному целевому участку гена – пус для *Staphylococcus aureus* произвели последовательные разведения выделенной ДНК от 966 984 копий ДНК/мкл (-1) до 1 копий ДНК/мкл (-7). Предел обнаружения, представляет собой наименьшее количество анализируемого вещества, которое может быть обнаружено и определено с помощью анализа кривых ПЦР с приемлемым уровнем точности.

Таблица – Расчет ДНК, копий/мкл *Staphylococcus aureus*

Источник ДНК		<i>S.aureus</i>
Длина ДНК, п.о.		2821361
Спектрофотометрия нг/мкл		29,9
Моль/мкл		1,60572E-17
Копий /мкл'		9 669 844,66878
Разведения	-1	966 984
	-2	96 698
	-3	9 670
	-4	967
	-5	97
	-6	10
	-7	1
	-8	0
	-9	0

Для проведения ПЦР использовали реакционную смесь следующего состава: 10X Таq буфер – 2 µl, Mg²⁺ – 2 µl, смесь dNTP – 1 µl, MQ вода – 5 µl, 10X Таq ДНК-полимераза – 2 µl, смесь праймеров – 4 µl, ДНК – 4 µl.

Постановку ПЦР проводили согласно подготовленным рекомендациям по проведению мультиплексной ПЦР для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

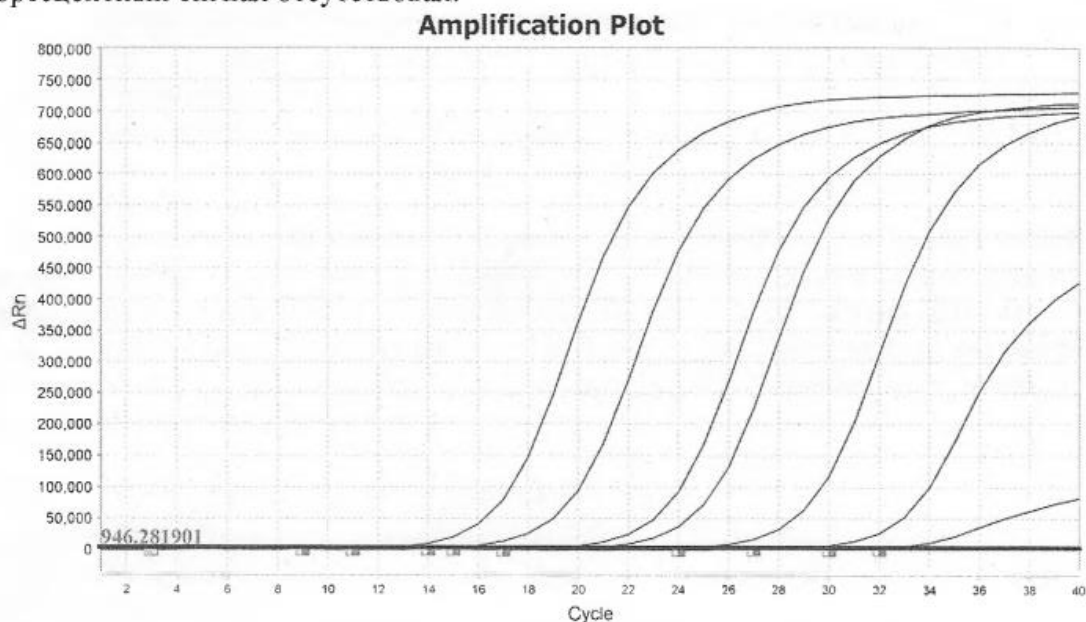
При проведении ПЦР использовали следующий протокол выполнения амплификации:

№ блока	t° С	Время		Число циклов	Режим оптических измерений
		мин	сек		
1	95	5	0	1	измерений
2	94	0	10	40	FAM
	60	0	20		

Заключение

Интерпретацию результатов проводили на основании наличия (отсутствия) пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией, что определяло значение порогового цикла (Ct).

Кривые накопления флуоресцентного сигнала наблюдались в диапазонах разведения исследуемой ДНК от -1 до -6 степени, в диапазонах разведения от -7 до -9 степени, флуоресцентный сигнал отсутствовал.




Рисунок– Кривые накопления флуоресцентного сигнала последовательных разведений выделенных ДНК копий/мкл *Staphylococcus aureus*

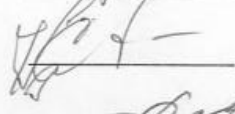
По результатам проведенного эксперимента, диагностическая чувствительность тест системы для целевого гена *nuc Staphylococcus aureus*, составила 10 копий ДНК/мкл.

Члены комиссии:

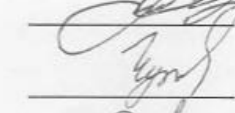
Заведующий «Костанайская НИВС» филиала
ТОО КазНИВИ - председатель комиссии, д.в.н.
Ветеринарный врач Костанайского ОФ «РВЛ»,
м.с\х. наук
Заведующая ИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, к.в.н.
Заведующая НИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, PhD, профессор
Научный сотрудник НИИ прикладной
биотехнологии КРУ им. А. Байтурсынова, м.в.н.




Б. Мустафин



К. Алиев



Г. Чужебаева



Р. Рыщанова

Б. Байменов



«Утверждаю»

Проректор по ИИиЦ
КРУ им. А. Байтурсынова

Ж. Жарлыгасов

2023 г.

Акт №4

комиссионных испытаний чувствительности и специфичности мультиплексной полимеразной цепной реакции для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя, доктора ветеринарных наук Мустафина Б.М.; членов – м.в.н. Алиева К.Т., PhD Рыщановой Р.М., к.в.н. Чужебаевой Г.Д., м.в.н. Байменова Б.М. составили настоящий акт о том что 25.04.2023 г. провели лабораторные испытания специфичности полимеразной цепной реакции для выявления *Staphylococcus aureus* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

Испытания проводились в отделе молекулярно-биологических исследований КРУ им. А. Байтурсынова.

Материалы и методы

Для оценки аналитической чувствительности тестовых праймеров и зонда к выбранному целевому участку гена – Glck для *Streptococcus agalactiae* произвели последовательные разведения выделенной ДНК от 1 125 282 (-1) копий ДНК/мкл до 1 копий ДНК/мкл (-7). Предел обнаружения, представляет собой наименьшее количество анализируемого вещества, которое может быть обнаружено и определено с помощью анализа кривых ПЦР с приемлемым уровнем точности.

Таблица – Расчет ДНК, копий/мкл *Streptococcus agalactiae*

Источник ДНК	<i>Str. agalactiae</i>	
Длина ДНК, п.о.	2074179	
Спектрофотометрия нг/мкл	25,58	
Моль/мкл	1,86857E-17	
Копий /мкл	11 252 817,50050	
Разведения	-1	1 125 282
	-2	112 528
	-3	11 253
	-4	1 125
	-5	113
	-6	11
	-7	1
	-8	0
	-9	0

Для проведения ПЦР использовали реакционную смесь следующего состава: 10X Taq буфер – 2 µl, Mg²⁺ – 2 µl, смесь dNTP – 1 µl, MQ вода – 5 µl, 10X Taq ДНК-полимераза – 2 µl, смесь праймеров – 4 µl, ДНК – 4 µl.

Постановку ПЦР проводили согласно подготовленным рекомендациям по проведению мультиплексной ПЦР для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

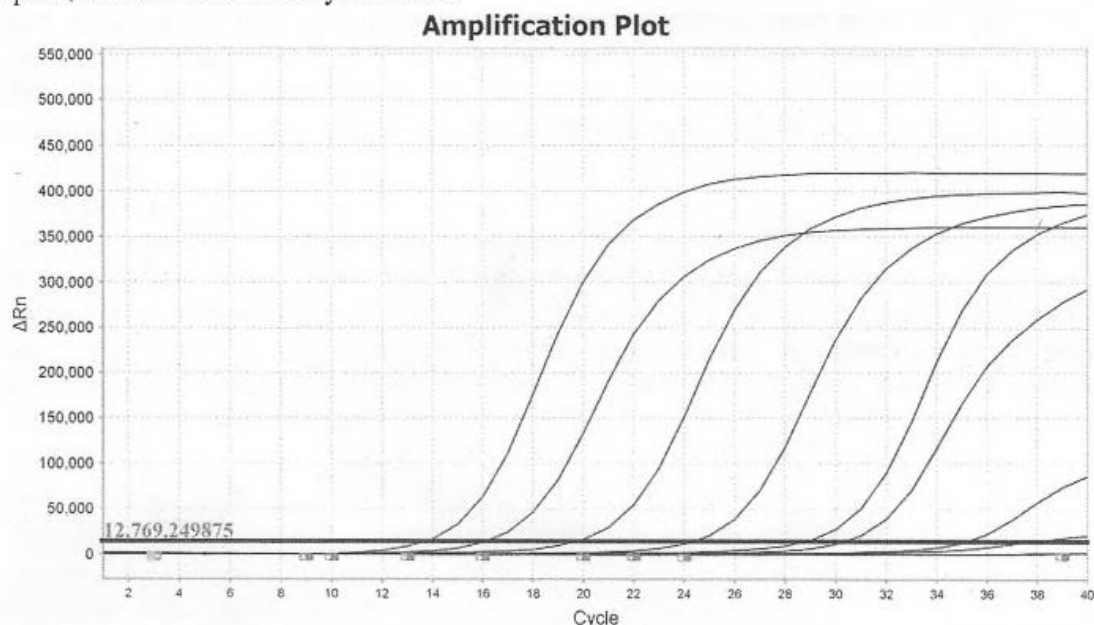
При проведении ПЦР использовали следующий протокол выполнения амплификации:

№ блока	t° C	Время		Число циклов	Режим оптических измерений
		мин	сек		
1	95	5	0	1	
2	94	0	10	40	FAM, JOE, ROX, TAMRA
	60	0	20		

Заключение

Интерпретацию результатов проводили на основании наличия (отсутствия) пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией, что определяло значение порогового цикла (Ct).

Кривые накопления флуоресцентного сигнала наблюдались в диапазонах разведения исследуемой ДНК от -1 до -6 степени, в диапазонах разведения от -7 до -9 степени, флуоресцентный сигнал отсутствовал.



Рисунок– Кривые накопления флуоресцентного сигнала последовательных разведений выделенных ДНК копий/мкл *Streptococcus agalactiae*

По результатам проведенного эксперимента, диагностическая чувствительность тест системы для целевого гена пус *Streptococcus agalactiae*, составила 11 копий ДНК/мкл.

Члены комиссии:

Заведующий «Костанайская НИВС» филиала
ТОО КазНИВИ - председатель комиссии, д.в.н.
Ветеринарный врач Костанайского ОФ «РВЛ»,
м.с.х. наук
Заведующая ИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, к.в.н.
Заведующая ИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, PhD, профессор
Научный сотрудник НИИ прикладной
биотехнологии КРУ им. А. Байтурсынова, м.в.н.











Б. Мустафин

К. Алиев

Г. Чужебаева

Р. Рыщанова

Б. Байменов



Акт №5

комиссионных испытаний чувствительности и специфичности мультиплексной полимеразной цепной реакции для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя, доктора ветеринарных наук Мустафина Б.М.; членов – м.в.н. Алиева К.Т., PhD Рыщановой Р.М., к.в.н. Чужебаевой Г.Д., м.в.н. Байменова Б.М. составили настоящий акт о том что 05.05.2023 г. провели лабораторные испытания специфичности полимеразной цепной реакции для выявления *Staphylococcus aureus* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

Испытания проводились в отделе молекулярно-биологических исследований КРУ им. А. Байтурсынова.

Материалы и методы

Для оценки аналитической специфичности тестовых праймеров и зонда к выбранному целевому участку гена – пус для *Staphylococcus aureus* было случайно отобрано и проанализировано 22 изолята, выделенных из смывов, биоматериала животных, и продуктов животного происхождения (*S.aureus*, *S.haemolyticus*, *S.epidermidis*, *Str.pyogenes*, *Str.agalactiae*, *Enterococcus faecium*, *E.coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *S.chromogenes*, *S.simulans*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*); а так же штамма *S.aureus*, полученного из Республиканской коллекции микроорганизмов (РК).

Для проведения ПЦР использовали реакционную смесь следующего состава: 10X Taq буфер – 2 µl, Mg²⁺ – 2 µl, смесь dNTP – 1 µl, MQ вода – 5 µl, 10X Taq ДНК-полимераза – 2 µl, смесь праймеров – 4 µl, ДНК – 4 µl.

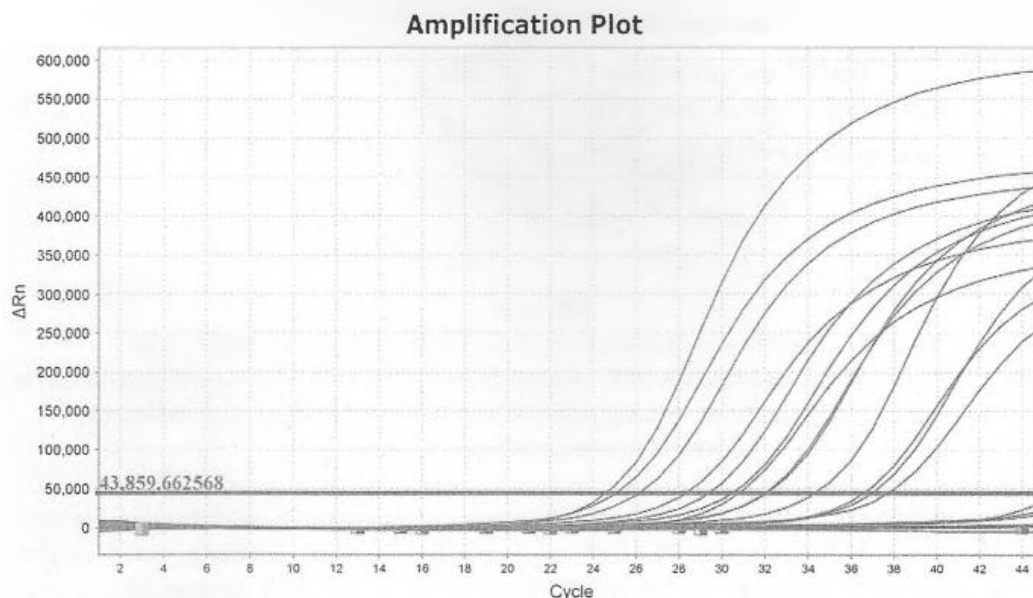
Постановку ПЦР проводили согласно подготовленным рекомендациям по проведению мультиплексной ПЦР для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

При проведении ПЦР использовали следующий протокол выполнения амплификации:

№ блока	t° C	Время		Число циклов	Режим оптических измерений
		мин	сек		
1	95	5	0	1	измерений
2	94	0	10	40	FAM
	60	0	20		

Заключение

Интерпретацию результатов проводили на основании наличия (отсутствия) пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией, что определяло значение порогового цикла (Ct).




Рисунок– Положительные результаты ПЦР-РВ. Циклы до достижения порога (значения C_t) показали результат ($21,7 > C_t > 34,6$) в зависимости от концентрации ДНК в образцах.


Все изоляты *S.aureus* были правильно идентифицированы по выбранному целевому участку гена пус. Изоляты, не относящиеся к *S.aureus*, дали отрицательный результат. Таким образом, присутствие ДНК нецелевых видов бактерий никак не влияет на идентификацию *S. aureus* по выбранному специфичному гену.

Члены комиссии:

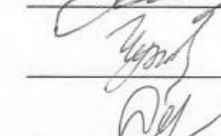
Заведующий «Костанайская НИВС» филиала
ТОО КазНИВИ - председатель комиссии, д.в.н.
Ветеринарный врач Костанайского ОФ «РВЛ»,
м.с\х. наук
Заведующая ИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, к.в.н.
Заведующая НИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, PhD, профессор
Научный сотрудник НИИ прикладной
биотехнологии КРУ им. А. Байтурсынова, м.в.н.



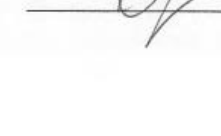
Б. Мустафин




К. Алиев



Г. Чужебаева



Р. Рыцанова



Б. Байменов



«Утверждаю»

Проректор по ИИиЦ
КРУ им. А. Байтурсынова

Ж. Жарлыгасов

2023 г.

Акт №6

комиссионных испытаний чувствительности и специфичности мультиплексной полимеразной цепной реакции для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя, доктора ветеринарных наук Мустафина Б.М.; членов – м.в.н. Алиева К.Т., PhD Рыщановой Р.М., к.в.н. Чужебаевой Г.Д., м.в.н. Байменова Б.М. составили настоящий акт о том что 08.05.2023 г. провели лабораторные испытания специфичности полимеразной цепной реакции для выявления *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

Испытания проводились в отделе молекулярно-биологических исследований КРУ им. А. Байтурсынова.

Материалы и методы

Для оценки аналитической специфичности тестовых праймеров и зонда к выбранному целевому участку гена – Glck для *Streptococcus agalactiae* было случайно отобрано и проанализировано 17 изолятов, выделенных из смывов, биоматериала животных, и продуктов животного происхождения (*S.aureus*, *S.haemolyticus*, *S.epidermidis*, *Str.pyogenes*, *Str.agalactiae*, *Enterococcus faecium*, *E.coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *S.chromogenes*, *S.simulans*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*); а так же референтного штамма *Str.agalactiae* (ATCC®13813, «Lofilchem» Италия).

Для проведения ПЦР использовали реакционную смесь следующего состава: 10X Taq буфер – 2 µl, Mg²⁺ – 2 µl, смесь dNTP – 1 µl, MQ вода – 5 µl, 10X Taq ДНК-полимераза – 2 µl, смесь праймеров – 4 µl, ДНК – 4 µl.

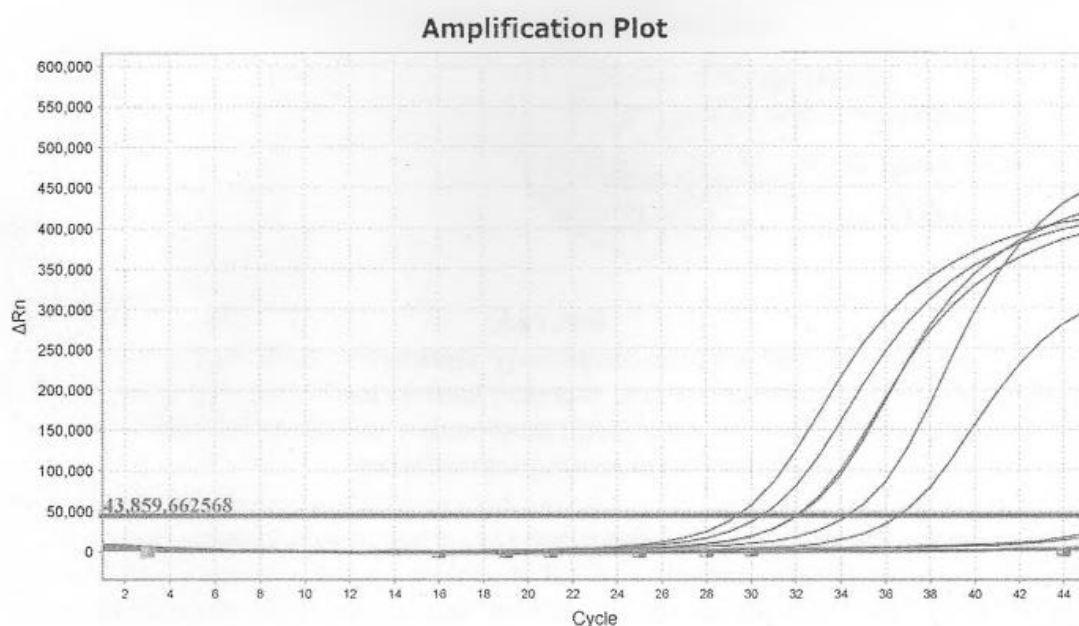
Постановку ПЦР проводили согласно подготовленным рекомендациям по проведению мультиплексной ПЦР для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

При проведении ПЦР использовали следующий протокол выполнения амплификации:

№ блока	t° C	Время		Число циклов	Режим оптических измерений
		мин	сек		
1	95	5	0	1	FAM
2	94	0	10	40	
	60	0	20		

Заключение

Интерпретацию результатов проводили на основании наличия (отсутствия) пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией, что определяло значение порогового цикла (Ct).



Рисунок– Положительные результаты ПЦР-РВ. Циклы до достижения порога (значения C_t) показали результат ($24,3 > C_t > 32,1$) в зависимости от концентрации ДНК в образцах.

Все изоляты *Str. agalactiae* были правильно идентифицированы по выбранному целевому участку гена *Glck*. Изоляты, не относящиеся к *Str. agalactiae*, дали отрицательный результат. Таким образом, присутствие ДНК нецелевых видов бактерий никак не влияет на идентификацию *Str. agalactiae* по выбранному специфичному гену.

Члены комиссии:

Заведующий «Костанайская НИВС» филиала
ТОО КазНИВИ - председатель комиссии, д.в.н.
Ветеринарный врач Костанайского ОФ «РВЛ»,
м.с\х. наук
Заведующая ИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, к.в.н.
Заведующая НИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, PhD, профессор
Научный сотрудник НИИ прикладной
биотехнологии КРУ им. А. Байтурсынова, м.в.н.

	Б. Мустафин
	К. Алиев
	Г. Чужебаева
	Р. Рыщанова
	Б. Байменов



Акт №7

комиссионных испытаний чувствительности и специфичности мультиплексной полимеразной цепной реакции для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя, доктора ветеринарных наук Мустафина Б.М.; членов – м.в.н. Алиева К.Т., PhD Рыщановой Р.М., к.в.н. Чужебаевой Г.Д., м.в.н. Байменова Б.М. составили настоящий акт о том что 16.05.2023 г. провели лабораторные испытания специфичности полимеразной цепной реакции для выявления *Staphylococcus aureus* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

Испытания проводились в отделе молекулярно-биологических исследований КРУ им. А. Байтурсынова.

Материалы и методы

Для оценки аналитической специфичности тестовых праймеров и зонда к выбранному целевому участку гена – пус для *Staphylococcus aureus* было случайно отобрано и проанализировано 23 изолята, выделенных из смывов, биоматериала животных, и продуктов животного происхождения (*S.aureus*, *S.haemolyticus*, *S.epidermidis*, *Str.pyogenes*, *Str.agalactiae*, *Enterococcus faecium*, *E.coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *S.chromogenes*, *S.simulans*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*); а так же штамма *S.aureus*, полученного из Республиканской коллекции микроорганизмов (РК).

Для проведения ПЦР использовали реакционную смесь следующего состава: 10X Taq буфер – 2 µl, Mg²⁺ – 2 µl, смесь dNTP – 1 µl, MQ вода – 5 µl, 10X Taq ДНК-полимераза – 2 µl, смесь праймеров – 4 µl, ДНК – 4 µl.

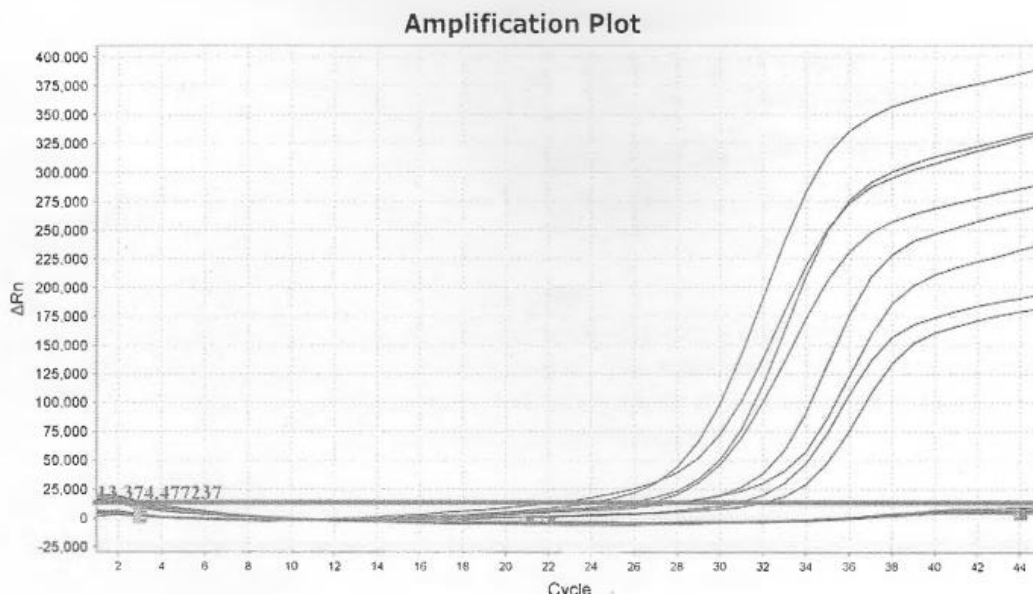
Постановку ПЦР проводили согласно подготовленным рекомендациям по проведению мультиплексной ПЦР для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

При проведении ПЦР использовали следующий протокол выполнения амплификации:

№ блока	t° C	Время		Число циклов	Режим
		мин	сек		оптических измерений
1	95	5	0	1	
2	94	0	10	40	FAM
	60	0	20		

Заключение

Интерпретацию результатов проводили на основании наличия (отсутствия) пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией, что определяло значение порогового цикла (Ct).




Рисунок– Положительные результаты ПЦР-РВ. Циклы до достижения порога (значения Ct) показали результат ($20,8 > Ct > 32,2$) в зависимости от концентрации ДНК в образцах.

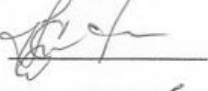
Все изоляты *S.aureus* были правильно идентифицированы по выбранному целевому участку гена *nuc*. Изоляты, не относящиеся к *S.aureus*, дали отрицательный результат. Таким образом, присутствие ДНК нецелевых видов бактерий никак не влияет на идентификацию *S. aureus* по выбранному специфичному гену.

Члены комиссии:


Заведующий «Костанайская НИВС» филиала
ТОО КазНИВИ - председатель комиссии, д.в.н.
Ветеринарный врач Костанайского ОФ «РВЛ»,
м.с\х. наук
Заведующая ИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, к.в.н.
Заведующая НИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, PhD, профессор
Научный сотрудник НИИ прикладной
биотехнологии КРУ им. А. Байтурсынова, м.в.н.



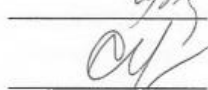
Б. Мустафин




К. Алиев



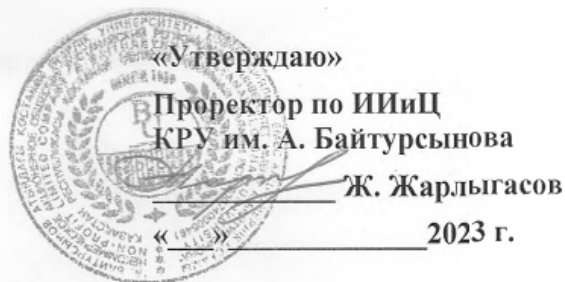
Г. Чужебаева



Р. Рыщанова



Б. Байменов



Акт №8

комиссионных испытаний чувствительности и специфичности мультиплексной полимеразной цепной реакции для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя, доктора ветеринарных наук Мустафина Б.М.; членов – м.в.н. Алиева К.Т., PhD Рыщановой Р.М., к.в.н. Чужебаевой Г.Д., м.в.н. Байменова Б.М. составили настоящий акт о том что 24.05.2023 г. провели лабораторные испытания специфичности полимеразной цепной реакции для выявления *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

Испытания проводились в отделе молекулярно-биологических исследований КРУ им. А. Байтурсынова.

Материалы и методы

Для оценки аналитической специфичности тестовых праймеров и зонда к выбранному целевому участку гена – Glck для *Streptococcus agalactiae* было случайно отобрано и проанализировано 17 изолятов, выделенных из смывов, биоматериала животных, и продуктов животного происхождения (*S.aureus*, *S.haemolyticus*, *S.epidermidis*, *Str.pyogenes*, *Str.agalactiae*, *Enterococcus faecium*, *E.coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *S.chromogenes*, *S.simulans*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*); а так же референтного штамма *Str.agalactiae* (ATCC®13813, «Lofilchem» Италия).

Для проведения ПЦР использовали реакционную смесь следующего состава: 10X Taq буфер – 2 µl, Mg2+ – 2 µl, смесь dNTP – 1 µl, MQ вода – 5 µl, 10X Taq ДНК-полимераза – 2 µl, смесь праймеров – 4 µl, ДНК – 4 µl.

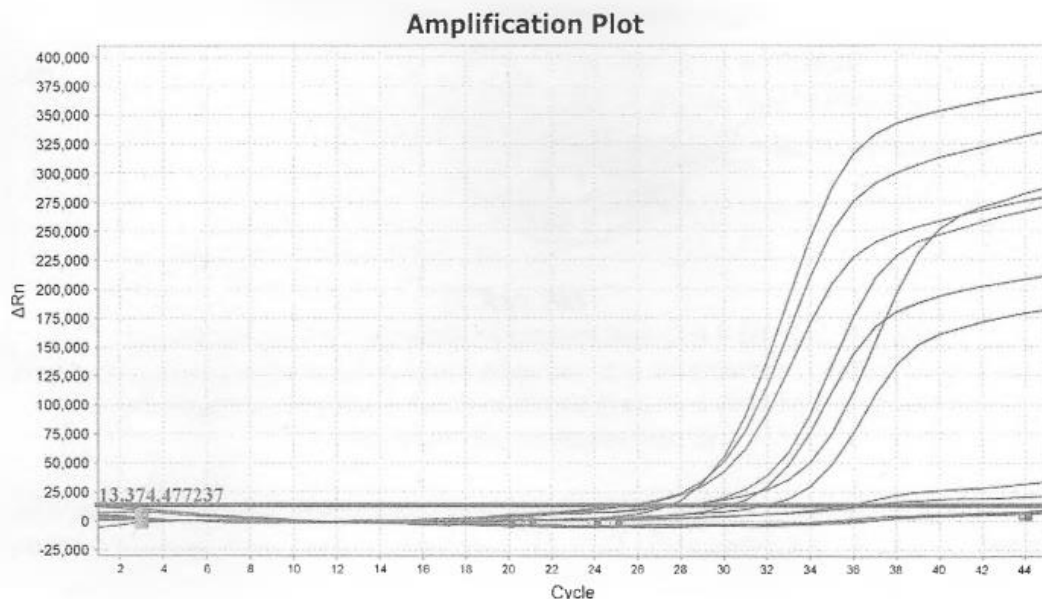
Постановку ПЦР проводили согласно подготовленным рекомендациям по проведению мультиплексной ПЦР для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

При проведении ПЦР использовали следующий протокол выполнения амплификации:

№ блока	t° C	Время мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений
1	95	5	0	1	измерений
2	94	0	10	40	FAM
	60	0	20		

Заключение

Интерпретацию результатов проводили на основании наличия (отсутствия) пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией, что определяло значение порогового цикла (Ct).



Рисунок– Положительные результаты ПЦР-РВ. Циклы до достижения порога (значения C_t) показали результат ($26,1 > C_t > 32,2$) в зависимости от концентрации ДНК в образцах.

Все изоляты *Str. agalactiae* были правильно идентифицированы по выбранному целевому участку гена *GlcK*. Изоляты, не относящиеся к *Str. agalactiae*, дали отрицательный результат. Таким образом, присутствие ДНК нецелевых видов бактерий никак не влияет на идентификацию *Str. agalactiae* по выбранному специфичному гену.

Члены комиссии:

Заведующий «Костанайская НИВС» филиала
ТОО КазНИВИ - председатель комиссии, д.в.н.
Ветеринарный врач Костанайского ОФ «РВЛ»,
м.с\х. наук

Заведующая ИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, к.в.н.

Заведующая НИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, PhD, профессор

Научный сотрудник НИИ прикладной
биотехнологии КРУ им. А. Байтурсынова, м.в.н.

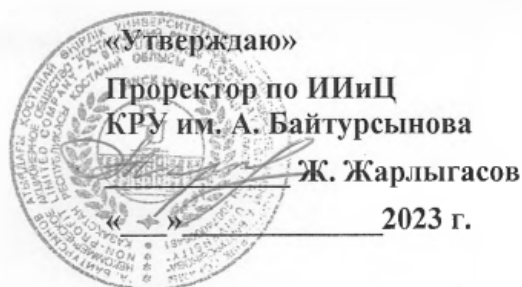
Б. Мустафин

К. Алиев

Г. Чужебаева

Р. Рыщанова

Б. Байменов



Акт №9

комиссионных испытаний чувствительности и специфичности мультиплексной полимеразной цепной реакции для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя, доктора ветеринарных наук Мустафина Б.М.; членов – м.в.н. Алиева К.Т., PhD Рыщановой Р.М., к.в.н. Чужебаевой Г.Д., м.в.н. Байменова Б.М. составили настоящий акт о том что 05.06.2023 г. провели лабораторные испытания специфичности полимеразной цепной реакции для выявления *Staphylococcus aureus* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

Испытания проводились в отделе молекулярно-биологических исследований КРУ им. А. Байтурсынова.

Материалы и методы

Для оценки аналитической специфичности тестовых праймеров и зонда к выбранному целевому участку гена – пус для *Staphylococcus aureus* было случайно отобрано и проанализировано 20 изолятов, выделенных из смывов, биоматериала животных, и продуктов животного происхождения (*S.aureus*, *S.haemolyticus*, *S.epidermidis*, *Str.pyogenes*, *Str.agalactiae*, *Enterococcus faecium*, *E.coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *S.chromogenes*, *S.simulans*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*); а так же штамма *S.aureus*, полученного из Республиканской коллекции микроорганизмов (РК).

Для проведения ПЦР использовали реакционную смесь следующего состава: 10X Taq буфер – 2 µl, Mg²⁺ – 2 µl, смесь dNTP – 1 µl, MQ вода – 5 µl, 10X Taq ДНК-полимераза – 2 µl, смесь праймеров – 4 µl, ДНК – 4 µl.

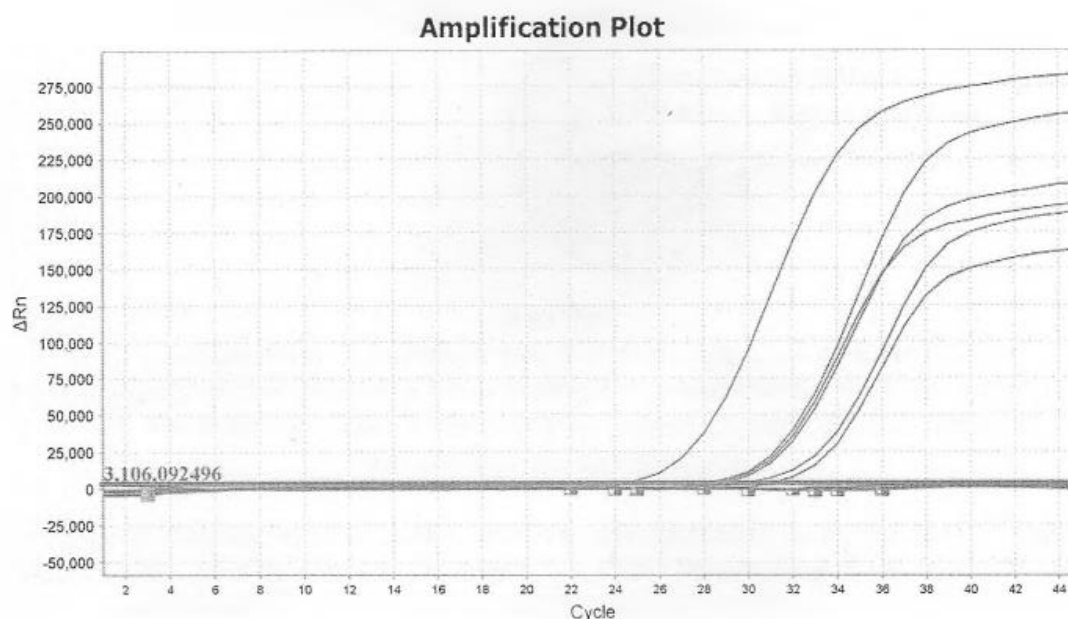
Постановку ПЦР проводили согласно подготовленным рекомендациям по проведению мультиплексной ПЦР для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

При проведении ПЦР использовали следующий протокол выполнения амплификации:

№ блока	t° C	Время		Число циклов	Режим оптических измерений
		мин	сек		
1	95	5	0	1	измерений
2	94	0	10	40	FAM
	60	0	20		

Заключение

Интерпретацию результатов проводили на основании наличия (отсутствия) пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией, что определяло значение порогового цикла (Ct).




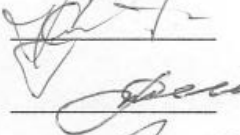
Рисунок– Положительные результаты ПЦР-РВ. Циклы до достижения порога (значения C_t) показали результат ($24,5 > C_t > 30,6$) в зависимости от концентрации ДНК в образцах.

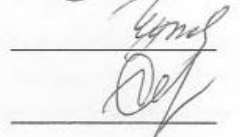
Все изоляты *S.aureus* были правильно идентифицированы по выбранному целевому участку гена пус. Изоляты, не относящиеся к *S.aureus*, дали отрицательный результат. Таким образом, присутствие ДНК нецелевых видов бактерий никак не влияет на идентификацию *S. aureus* по выбранному специфичному гену.


Члены комиссии:


Заведующий «Костанайская НИВС» филиала
ТОО КазНИВИ - председатель комиссии, д.в.н.
Ветеринарный врач Костанайского ОФ «РВЛ»,
м.с\х. наук
Заведующая ИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, к.в.н.
Заведующая НИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, PhD, профессор
Научный сотрудник НИИ прикладной
биотехнологии КРУ им. А. Байтурсынова, м.в.н.


Б. Мустафин


К. Алиев


Г. Чужебаева


Р. Рыцанова


Б. Байменов



Акт №10

комиссионных испытаний чувствительности и специфичности мультиплексной полимеразной цепной реакции для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя, доктора ветеринарных наук Мустафина Б.М.; членов – м.в.н. Алиева К.Т., PhD Рыщановой Р.М., к.в.н. Чужебаевой Г.Д., м.в.н. Байменова Б.М. составили настоящий акт о том что 13.06.2023 г. провели лабораторные испытания специфичности полимеразной цепной реакции для выявления *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

Испытания проводились в отделе молекулярно-биологических исследований КРУ им. А. Байтурсьнова.

Материалы и методы

Для оценки аналитической специфичности тестовых праймеров и зонда к выбранному целевому участку гена – Glck для *Streptococcus agalactiae* было случайно отобрано и проанализировано 28 изолятов, выделенных из смывов, биоматериала животных, и продуктов животного происхождения (*S.aureus*, *S.haemolyticus*, *S.epidermidis*, *Str.pyogenes*, *Str.agalactiae*, *Enterococcus faecium*, *E.coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *S.chromogenes*, *S.simulans*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*); а так же референтного штамма *Str.agalactiae* (ATCC®13813, «Lofilchem» Италия).

Для проведения ПЦР использовали реакционную смесь следующего состава: 10X Taq буфер – 2 µl, Mg²⁺ – 2 µl, смесь dNTP – 1 µl, MQ вода – 5 µl, 10X Taq ДНК-полимераза – 2 µl, смесь праймеров – 4 µl, ДНК – 4 µl.

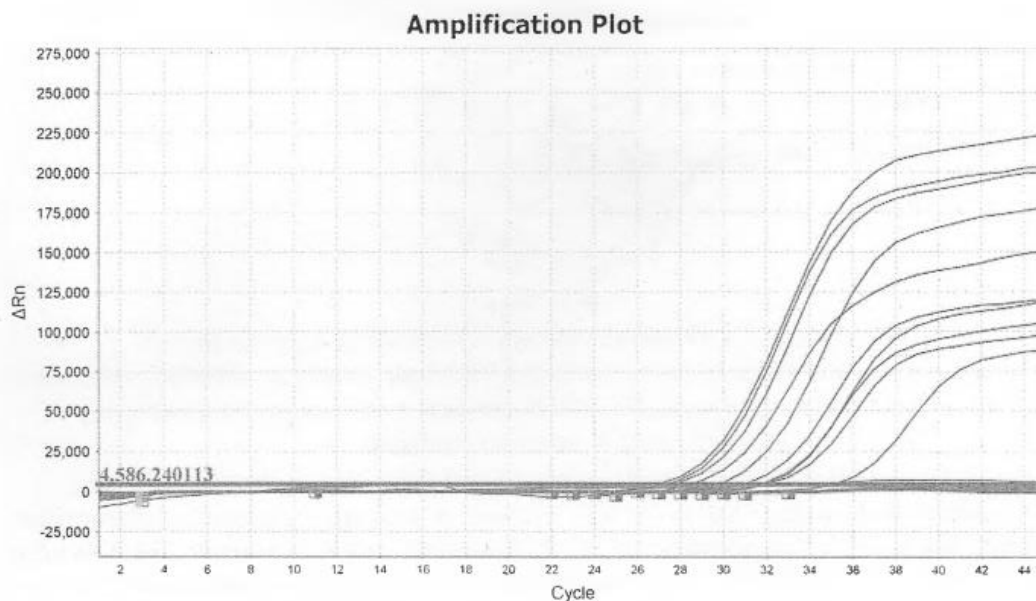
Постановку ПЦР проводили согласно подготовленным рекомендациям по проведению мультиплексной ПЦР для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

При проведении ПЦР использовали следующий протокол выполнения амплификации:

№ блока	t° C	Время		Число циклов	Режим оптических измерений
		мин	сек		
1	95	5	0	1	измерений
2	94	0	10	40	FAM
	60	0	20		

Заключение

Интерпретацию результатов проводили на основании наличия (отсутствия) пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией, что определяло значение порогового цикла (Ct).




Рисунок– Положительные результаты ПЦР-РВ. Циклы до достижения порога (значения C_t) показали результат ($26,9 > C_t > 34,8$) в зависимости от концентрации ДНК в образцах.


Все изоляты *Str. agalactiae* были правильно идентифицированы по выбранному целевому участку гена *Glck*. Изоляты, не относящиеся к *Str. agalactiae*, дали отрицательный результат. Таким образом, присутствие ДНК нецелевых видов бактерий никак не влияет на идентификацию *Str. agalactiae* по выбранному специфичному гену.

Члены комиссии:

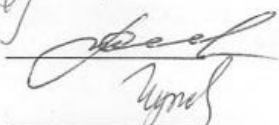
Заведующий «Костанайская НИВС» филиала
ТОО КазНИВИ - председатель комиссии, д.в.н.
Ветеринарный врач Костанайского ОФ «РВЛ»,
м.с/х. наук
Заведующая ИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, к.в.н.
Заведующая НИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, PhD, профессор
Научный сотрудник НИИ прикладной
биотехнологии КРУ им. А. Байтурсынова, м.в.н.



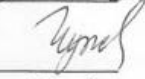
Б. Мустафин




К. Алиев



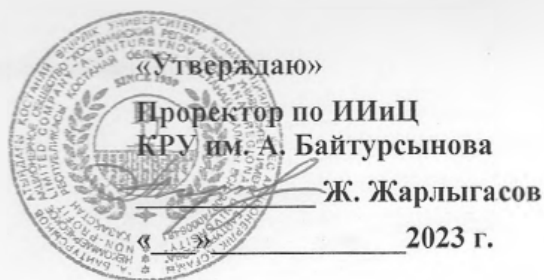
Г. Чужебаева



Р. Рыцанова



Б. Байменов



Акт №11

комиссионных испытаний чувствительности и специфичности мультиплексной полимеразной цепной реакции для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя, доктора ветеринарных наук Мустафина Б.М.; членов – м.в.н. Алиева К.Т., PhD Рыщановой Р.М., к.в.н. Чужебаевой Г.Д., м.в.н. Байменова Б.М. составили настоящий акт о том что 20.06.2023 г. провели лабораторные испытания специфичности полимеразной цепной реакции для выявления *Staphylococcus aureus* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

Испытания проводились в отделе молекулярно-биологических исследований КРУ им. А. Байтурсынова.

Материалы и методы

Для оценки аналитической специфичности тестовых праймеров и зонда к выбранному целевому участку гена – пус для *Staphylococcus aureus* было случайно отобрано и проанализировано 25 изолятов, выделенных из смывов, биоматериала животных, и продуктов животного происхождения (*S.aureus*, *S.haemolyticus*, *S.epidermidis*, *Str.pyogenes*, *Str.agalactiae*, *Enterococcus faecium*, *E.coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *S.chromogenes*, *S.simulans*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*); а так же штамма *S.aureus*, полученного из Республиканской коллекции микроорганизмов (РК).

Для проведения ПЦР использовали реакционную смесь следующего состава: 10X Таq буфер – 2 µl, Mg²⁺ – 2 µl, смесь dNTP – 1 µl, MQ вода – 5 µl, 10X Таq ДНК-полимераза – 2 µl, смесь праймеров – 4 µl, ДНК – 4 µl.

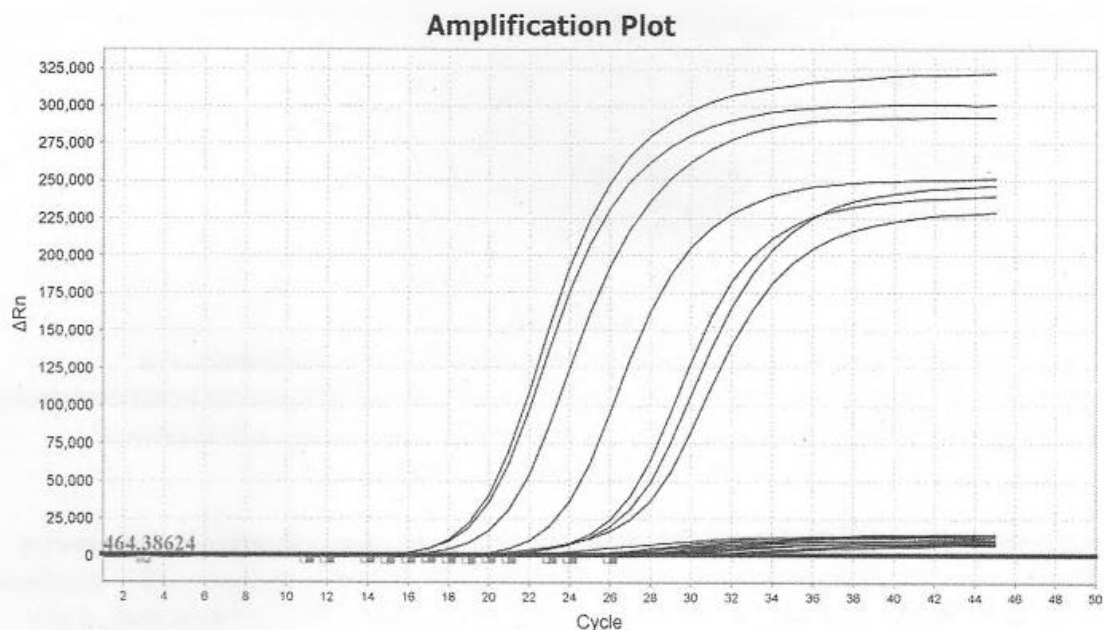
Постановку ПЦР проводили согласно подготовленным рекомендациям по проведению мультиплексной ПЦР для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

При проведении ПЦР использовали следующий протокол выполнения амплификации:

№ блока	t° C	Время		Число циклов	Режим оптических измерений
		мин	сек		
1	95	5	0	1	измерений
2	94	0	10	40	FAM
	60	0	20		

Заключение

Интерпретацию результатов проводили на основании наличия (отсутствия) пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией, что определяло значение порогового цикла (Ct).



Рисунок– Положительные результаты ПЦР-РВ. Циклы до достижения порога (значения Ct) показали результат (16,1 > Ct > 22,3) в зависимости от концентрации ДНК в образцах.

Все изоляты *S.aureus* были правильно идентифицированы по выбранному целевому участку гена пус. Изоляты, не относящиеся к *S.aureus*, дали отрицательный результат. Таким образом, присутствие ДНК нецелевых видов бактерий никак не влияет на идентификацию *S. aureus* по выбранному специфичному гену.

Члены комиссии:

Заведующий «Костанайская НИВС» филиала
ТОО КазНИВИ - председатель комиссии, д.в.н.
Ветеринарный врач Костанайского ОФ «РВЛ»,
м.с/х. наук
Заведующая ИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, к.в.н.
Заведующая НИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, PhD, профессор
Научный сотрудник НИИ прикладной
биотехнологии КРУ им. А. Байтурсынова, м.в.н.

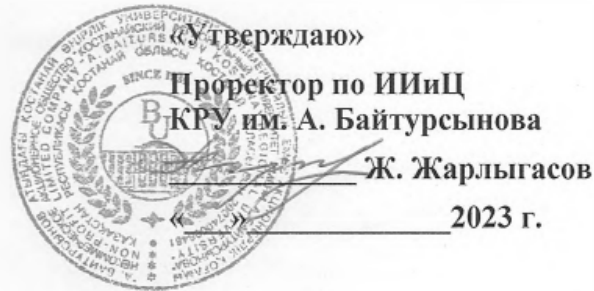
Б. Мустафин

К. Алиев

Г. Чужебаева

Р. Рыщанова

Б. Байменов



Акт №12

комиссионных испытаний чувствительности и специфичности мультимплексной полимеразной цепной реакции для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя, доктора ветеринарных наук Мустафина Б.М.; членов – м.в.н. Алиева К.Т., PhD Рыщановой Р.М., к.в.н. Чужебаевой Г.Д., м.в.н. Байменова Б.М. составили настоящий акт о том что 28.06.2023 г. провели лабораторные испытания специфичности полимеразной цепной реакции для выявления *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

Испытания проводились в отделе молекулярно-биологических исследований КРУ им. А. Байтурсынова.

Материалы и методы

Для оценки аналитической специфичности тестовых праймеров и зонда к выбранному целевому участку гена – Glck для *Streptococcus agalactiae* было случайно отобрано и проанализировано 27 изолятов, выделенных из смывов, биоматериала животных, и продуктов животного происхождения (*S.aureus*, *S.haemolyticus*, *S.epidermidis*, *Str.pyogenes*, *Str.agalactiae*, *Enterococcus faecium*, *E.coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *S.chromogenes*, *S.simulans*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*); а так же референтного штамма *Str.agalactiae* (ATCC®13813, «Lofilchem» Италия).

Для проведения ПЦР использовали реакционную смесь следующего состава: 10X Taq буфер – 2 µl, Mg²⁺ – 2 µl, смесь dNTP – 1 µl, MQ вода – 5 µl, 10X Taq ДНК-полимераза – 2 µl, смесь праймеров – 4 µl, ДНК – 4 µl.

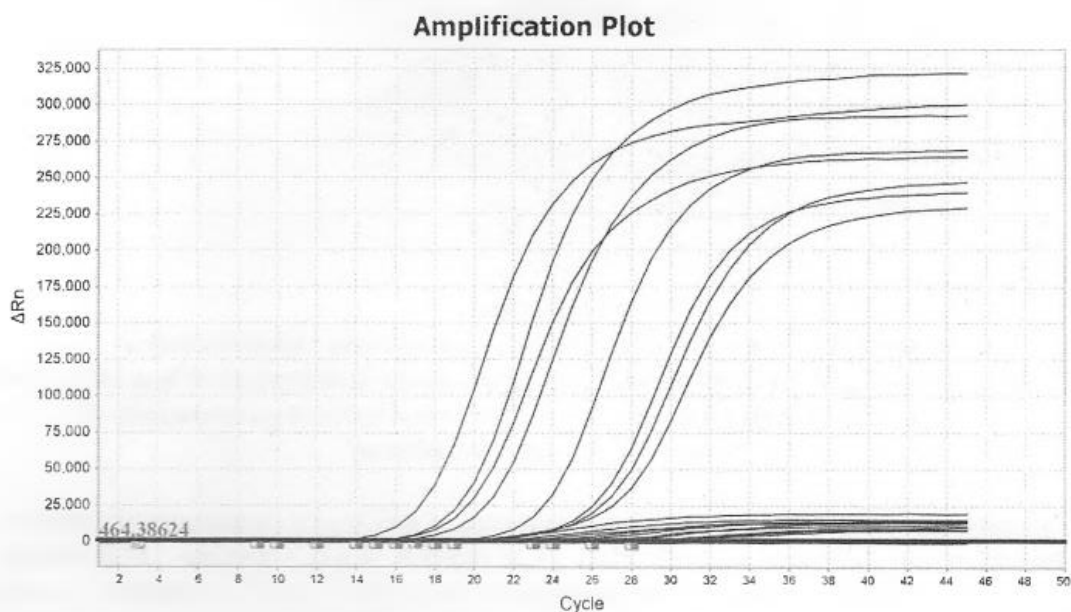
Постановку ПЦР проводили согласно подготовленным рекомендациям по проведению мультимплексной ПЦР для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определения локусов антибиотикорезистентности.

При проведении ПЦР использовали следующий протокол выполнения амплификации:

№ блока	t° C	Время		Число циклов	Режим оптических измерений
		мин	сек		
1	95	5	0	1	измерений
2	94	0	10	40	FAM
	60	0	20		

Заключение

Интерпретацию результатов проводили на основании наличия (отсутствия) пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией, что определяло значение порогового цикла (Ct).




Рисунок– Положительные результаты ПЦР-РВ. Циклы до достижения порога (значения C_t) показали результат ($14,2 > C_t > 20,3$) в зависимости от концентрации ДНК в образцах.

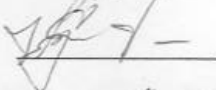
Все изоляты *Str. agalactiae* были правильно идентифицированы по выбранному целевому участку гена *Glck*. Изоляты, не относящиеся к *Str. agalactiae*, дали отрицательный результат. Таким образом, присутствие ДНК нецелевых видов бактерий никак не влияет на идентификацию *Str. agalactiae* по выбранному специфичному гену.

Члены комиссии:


Заведующий «Костанайская НИВС» филиала
ТОО КазНИВИ - председатель комиссии, д.в.н.
Ветеринарный врач Костанайского ОФ «РВЛ»,
м.с\х. наук
Заведующая ИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, к.в.н.
Заведующая НИЦ НИИ ПБ КРУ им. А.
Байтурсынова, PhD, профессор
Научный сотрудник НИИ прикладной
биотехнологии КРУ им. А. Байтурсынова, м.в.н.



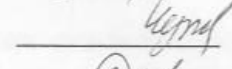
Б. Мустафин



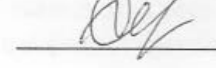
К. Алиев



Г. Чужебаева



Р. Рыщанова



Б. Байменов