

УТВЕРЖДАЮ

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

В.И.Покровский  
«30» 2014 г.



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения ДНК *Listeria monocytogenes* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

**«АмплиСенс<sup>®</sup> *Listeria monocytogenes*-скрин/монитор-FL»**

**АмплиСенс<sup>®</sup>**



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

IVD

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ .....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА .....	4
ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	6
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	7
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	9
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....	11
ОБРАЩЕНИЕ ОТХОДОВ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩИХ БИОЛОГИЧЕСКУЮ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА И ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ .....	14
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	15
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	19
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК .....	26
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА .....	29
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	30
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	30
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN).....	32
СОСТАВ .....	32
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» .....	32
А. Подготовка пробирок для амплификации .....	32
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» .....	34
В. Анализ и интерпретация результатов .....	35
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 2 (комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 и «ПЦР- комплект» вариант FRT-50 FN).....	44
СОСТАВ .....	44
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» .....	45
А. Подготовка пробирок для амплификации .....	45
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» .....	47
В. Анализ и интерпретация результатов .....	48
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 3 (комплект реагентов «ДНК-сорб-С» вариант 50 и «ПЦР- комплект» вариант FRT-50 FN).....	56
СОСТАВ .....	56
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» .....	57
А. Подготовка пробирок для амплификации .....	57
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» .....	58
В. Анализ и интерпретация результатов .....	60
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	68
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	70
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	72

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО STI-87	- экзогенный внутренний контрольный образец
ВКО Glob	- эндогенный внутренний контрольный образец
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеотидтрифосфат
K1, K2	- ДНК-калибраторы
K+	- положительный контроль ПЦР
K-	- отрицательный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПК	- положительный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

## НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Listeria monocytogenes*-скрин/монитор-FL» предназначен для качественного и количественного определения ДНК *L. monocytogenes* в биологическом материале (цельная кровь, цельная пуповинная кровь, спинномозговая жидкость (ликвор), пунктаты лимфатических узлов, мазки из респираторного тракта, мазки с конъюнктивы, амниотическая жидкость (околоплодные воды), плацента, мазки (соскобы) со слизистых оболочек влагаллица, моча, грудное молоко, меконий, фекалии; аутопсийный материал; объекты окружающей среды (концентраты образцов воды (сточная, питьевая, вода из поверхностных водоемов и т.д.)), жидкие среды для первичного обогащения продукта питания) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью комплектов реагентов, рекомендованных Производителем.

**ВНИМАНИЕ!** В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

## **ПРИНЦИП МЕТОДА**

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО STI-87) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемого микроорганизма и ДНК экзогенного и/или эндогенного ВКО с гибридационно-флуоресцентной детекцией. Экстракция ДНК из амниотической жидкости (околоплодных вод), грудного молока, спинномозговой жидкости (ликвора), мазков из респираторного тракта, мазков с конъюнктивы, мочи, мекония, фекалий, жидких сред для первичного обогащения продукта питания и концентратов образцов воды проводится в присутствии экзогенного внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87), который позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования. При экстракции ДНК из цельной крови, цельной пуповинной крови, плаценты, мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища, пунктатов лимфатических узлов и аутопсийного материала дополнительно происходит амплификация участка ДНК  $\beta$ -глобинового гена человека (эндогенного внутреннего контроля). Эндогенный внутренний контроль (ВКО Glob) позволяет не только контролировать этапы ПЦР-исследования, но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК *L. monocytogenes* при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности

флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Количественное определение ДНК *L. monocytogenes* возможно при проведении ПЦР в режиме «реального времени» и основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct). Для проведения количественного теста амплификацию ДНК из исследуемых образцов проводят одновременно с ДНК-калибраторами – образцами с известной концентрацией ДНК-мишени. По результатам амплификации ДНК-калибраторов строится калибровочная линия, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводятся 3 реакции – амплификация участков ДНК *L. monocytogenes* и ВКО STI-87, а также амплификация участка ДНК человека (ВКО Glob). Результаты амплификации ДНК *L. monocytogenes* и ВКО STI-87, а также ДНК ВКО Glob

регистрируются по 3 различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
ДНК-мишень	ДНК ВКО STI-87	ДНК <i>L. monocytogenes</i>	ДНК участка $\beta$ - глобинового гена (ВКО Glob)
Область амплификации	STI-87	Ген лиستيرиолизина O ( <i>hly</i> )	$\beta$ -глобиновый ген

## ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

**Форма 1** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN.

**Форма 2** включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN, «РИБО-преп» вариант 50.

**Форма 3** включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN, «ДНК-сорб-С» вариант 50.

**Форма 4** включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения амплификации ДНК *L. monocytogenes* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют выявлять ДНК в качественном и количественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Производителем.

Формы комплектации 2 и 3 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала и амплификацию ДНК *L. monocytogenes* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», и позволяет выявлять ДНК в качественном и количественном формате.

Форма комплектации 4 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

**ВНИМАНИЕ!** Форма комплектации 4 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

### Аналитическая чувствительность и линейный диапазон измерения

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, копии/мл	Линейный диапазон измерения, копии/мл
Цельная кровь, цельная пуповинная кровь, спинномозговая жидкость (ликвор), пунктаты лимфатических узлов, мазки из респираторного тракта, мазки с конъюнктивы, амниотическая жидкость (околоплодные воды), мазки (соскобы) со слизистых оболочек влагалища, моча, грудное молоко, меконий, фекалии, жидкие среды для первичного обогащения продукта питания, объекты окружающей среды (концентраты образцов воды)	100	Рибо-преп	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN	$5 \times 10^2$	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^8$
Плацента, аутопсийный материал	100	ДНК-сорб-С	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN	$5 \times 10^2$	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^8$

Данные значения характеристик достигаются при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

### Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагмент ДНК *L. monocytogenes*. Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании различных штаммов *L. monocytogenes*. Аналитическая специфичность набора

реагентов доказана при исследовании ДНК/РНК следующих микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus*, метициллин-резистентный стафилококк (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parasuis*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus* spp., *Neisseria subflava*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria sicca*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria elongata*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Toxoplasma gondii*, *Herpes simplex virus I (HSV I)*, *Herpes simplex virus II (HSV II)*, *Cytomegalovirus hominis (CMV)*, *Epstein-Barr virus (EBV)*, *Human herpesvirus 6 (HHV-6)*, *Human herpesvirus 7 (HHV-7)*, *Varicella-zoster virus (VZV)*, *JC virus (JCV)*, *BK virus (BKV)*, *Parvovirus B19*, *Enterovirus* и ДНК человека.

При тестировании образцов ДНК/РНК вышеперечисленных микроорганизмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

### **Воспроизводимость, повторяемость, правильность**

Воспроизводимость и повторяемость были определены путем тестирования разведений стандартного образца предприятия в образцах биологического материала.

Таблица 3

#### **Воспроизводимость**

Микроорганизм	Исходное значение концентрации, копий/мл	Количество повторов	Среднее значение концентрации, lg	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
<i>L. monocytogenes</i>	1x10 <sup>6</sup>	48	5,97	0,06	1,07
<i>L. monocytogenes</i>	5x10 <sup>4</sup>	48	4,66	0,13	2,76
<i>L. monocytogenes</i>	1x10 <sup>3</sup>	48	3,04	0,17	5,49



Таблица 4

**Повторяемость**

Микроорганизм	Исходное значение концентрации, копий/мл	Количество повторов	Среднее значение концентрации, Ig	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
<i>L. monocytogenes</i>	1x10 <sup>6</sup>	16	5,85	0,07	1,26
<i>L. monocytogenes</i>	5x10 <sup>4</sup>	16	4,66	0,06	1,23
<i>L. monocytogenes</i>	1x10 <sup>3</sup>	16	3,05	0,21	7,00

Таблица 5

**Правильность**

Микроорганизм	Количество повторов	Среднее значение измерения, Ig	Установленное значение, Ig	Систематическая погрешность (В), %
<i>L. monocytogenes</i>	100	8,02	8,00	0,25

**ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

Таблица 6

**Результаты тестирования набора реагентов «АмплиСенс® *Listeria monocytogenes*-скрин/монитор-FL» в сравнении с референтным методом**

Тип образца	Результаты применения набора реагентов «АмплиСенс® <i>Listeria monocytogenes</i> -скрин/монитор-FL»		Результаты применения референтного метода <sup>1</sup>	
			положительных	отрицательных
Штамм <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC® 7644™)	Количество повторов 60	положительных	60	0
		отрицательных	0	0

<sup>1</sup> В качестве референтного использовался набор реагентов «Листерия моноцитогенес (*Listeria monocytogenes*)» для выявления ДНК листерии моноцитогенес (*Listeria monocytogenes*) методом полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (ПУ № ФСР 2010/06931 от 26.04.2010 года, НПО ДНК-Технология (Россия))

**Результативность применения набора реагентов  
«АмплиСенс® *Listeria monocytogenes*-скрин/монитор-FL»**

Тип образцов	Биологический материал, содержащий фрагмент ДНК <i>L. monocytogenes</i>			Биологический материал, не содержащий ДНК <i>L. monocytogenes</i>		
	Количество образцов, шт	Результат		Количество образцов, шт	Результат	
		Положи- тельных	Отрица- тельных		Положи- тельных	Отрица- тельных
Цельная кровь	100	100	0	100	0	100
Цельная пуговинная кровь	100	100	0	100	0	100
спинномозговая жидкость (ликвор)	100	100	0	100	0	100
Пунктаты лимфатических узлов	100	100	0	100	0	100
Мазки из респираторного тракта	100	100	0	100	0	100
Мазки с конъюнктивы	100	100	0	100	0	100
Амниотическая жидкость (околоплодные воды)	100	100	0	100	0	100
Мазки (соскобы) со слизистых оболочек влагалища	100	100	0	100	0	100
Моча	100	100	0	100	0	100
Грудное молоко	100	100	0	100	0	100
Меконий	100	100	0	100	0	100
Фекалии	100	100	0	100	0	100
Жидкие среды для первичного обогащения продукта питания	100	100	0	100	0	100
Объекты окружающей среды (концентраты образцов воды)	100	100	0	100	0	100
Плацента	100	100	0	100	0	100
Аутопсийный материал	100	100	0	100	0	100

В качестве биологического материала, содержащего фрагмент ДНК *L. monocytogenes*, использовались образцы

разных типов биологического материала, содержащие разведение стандартного образца предприятия в концентрации не выше  $1 \times 10^4$ .

Таблица 8

**Диагностические характеристики набора реагентов  
«АмплиСенс® *Listeria monocytogenes*-скрин/монитор-FL»**

Тип образцов	Комплект для экстракции РНК/ДНК	Диагностическая чувствительность <sup>2</sup> (с доверительной вероятностью 90 %), не менее %	Диагностическая специфичность <sup>3</sup> , (с доверительной вероятностью 90 %), не менее %
Цельная кровь, цельная пуповинная кровь, спинномозговая жидкость (ликвор), пунктаты лимфатических узлов, мазки из респираторного тракта, мазки с конъюнктивы, амниотическая жидкость (околоплодные воды), мазки (соскобы) со слизистых оболочек влагалища, моча, грудное молоко, меконий, фекалии, жидкие среды для первичного обогащения продукта питания, объекты окружающей среды (концентраты образцов воды)	Рибо-преп	98	98
Плацента, аутопсийный материал	ДНК-сорб-С	98	98

## МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы

<sup>2</sup> Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

<sup>3</sup> Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе следует всегда выполнять следующие требования:

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром<sup>4</sup>. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).

---

<sup>4</sup> Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции используются одноразовые наконечники без фильтра.

- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм комплектации, не включающих комплект реагентов «РИБО-преп», «ДНК-сорб-С»):

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для формы комплектации, включающей комплект реагентов «РИБО-преп», «ДНК-сорб-С»):

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с

организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

## **ОБРАЩЕНИЕ ОТХОДОВ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩИХ БИОЛОГИЧЕСКУЮ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА И ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

*Listeria monocytogenes* – микроорганизм III группы патогенности. (СП 1.3.2322-08 Приложение N 1. Классификация микроорганизмов - возбудителей инфекционных заболеваний человека, простейших, гельминтов и ядов биологического происхождения по группам патогенности). Материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью и/или другими биологическими жидкостями, отходы из лабораторий, работающих с микроорганизмами III-IV групп патогенности, являются инфицированными или потенциально инфицированными. Класс опасности таких отходов – класс Б (эпидемиологически опасные отходы). Перед уничтожением отходы класса Б должны подвергаться обеззараживанию. Класс опасности неиспользованных реактивов, реактивов с истекшим сроком годности, которые не контактировали с потенциально инфицированными биологическими жидкостями – класс Г (токсикологически опасные отходы).

Медицинские отходы следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Настоящие санитарные правила устанавливают обязательные санитарно-эпидемиологические требования к обращению (сбору, временному хранению, обеззараживанию,

обезвреживанию, транспортированию) с отходами, образующимися в организациях при осуществлении медицинской и/или фармацевтической деятельности, выполнении лечебно-диагностических и оздоровительных процедур (далее - медицинские отходы), в зависимости от их класса опасности, а также к размещению, оборудованию и эксплуатации участка по обращению с медицинскими отходами, санитарно-противоэпидемическому режиму работы при обращении с медицинскими отходами.

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

### **Взятие исследуемого материала**

1. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ПУ № ФСР 2009/05514), «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (ПУ № ФСР 2009/05011) или другие рекомендованные Производителем.
2. Пробирки вакуумные для взятия, хранения и транспортировки проб крови для лабораторных исследований *in vitro* (например, Green Vac-Tube, Green Cross Medical Science Corporation, Корея).
3. Иглы стерильные двусторонние трубчатые к вакуумным пробиркам для взятия венозной крови для лабораторных исследований *in vitro* (например, Green-Vac<sup>®</sup>, Shina Corporation, («Шина Корпорейшн»), Корея).
4. Зонд гинекологический универсальный (например, ЗГУ «ЦМ», ООО «ЦЕНТРИМЕД», Россия или аналогичный).
5. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания или аналогичный).
6. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик» или аналогичный).
7. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

8. Одноразовые полипропиленовые пробирки с завинчивающимися крышками объемом 50 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

### **Предварительная подготовка исследуемого материала**

9. Гемолитик (ПУ № ФСР 2010/09505) - реагент для предобработки цельной крови.
10. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; рН=7,5±0,2).
11. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5; 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
12. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
13. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
14. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого материала.
15. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
16. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
17. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
18. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
19. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
20. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
21. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и



инактивации материалов.

### **Экстракция ДНК из исследуемых образцов**

22. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147), «ДНК-сорб-С» (РУ № ФСР 2008 03150) или другие рекомендованные Производителем – при работе с формой комплектации 1.
23. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.
24. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc.(«Эксиджен, Инк»), США).
25. Одноразовые наконечники для дозаторов с фильтром до 100 мкл, 200 мкл и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc.(«Эксиджен, Инк»), США).
26. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Axugen, Inc.(«Эксиджен, Инк»), США).
27. Штативы для наконечников и пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc.(«Эксиджен, Инк»), США или аналогичные).
28. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
29. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
30. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
31. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA Biosan, Латвия, Россия, или аналогичный).
32. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
33. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
34. Холодильник от 2 до 8 °С.
35. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки

по МУ 1.3.2569-09.

36. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

### **Аmplификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации**

37. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США или аналогичные).

38. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

39. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).

40. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).

41. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).

42. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

43. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

44. Емкость для сброса наконечников.

45. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT-50 FN:

а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси.

б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;

в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»),

Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.

46. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» имеющий 3 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие рекомендованные Производителем.

## **ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА**

Материалом для исследования служат:

- цельная кровь,
- цельная пуповинная кровь,
- спинномозговая жидкость (ликвор),
- пунктат лимфатических узлов,
- мазки из респираторного тракта (мазки из носа и мазки из ротоглотки),
- мазки с конъюнктивы,
- амниотическая жидкость (околоплодные воды),
- плацента,
- мазки (соскобы) со слизистых оболочек влагалища,
- моча,
- грудное молоко,
- меконий, фекалий,
- аутопсийный материал,
- жидкие среды для первичного обогащения продукта питания в соответствии с МУК 4.2.2872-11 «Методы выявления и идентификации патогенных бактерий-возбудителей инфекционных заболеваний с пищевым путем передачи в продуктах питания на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией»,
- объекты окружающей среды (концентраты образцов воды (сточная, питьевая, вода из поверхностных водоемов и т.д.)).

### **Цельная кровь и цельная пуповинная кровь**

Взятие крови следует производить натошак или через 3 часа после приема пищи одноразовой иглой диаметром 0,8-1,1 мм в

пробирку (специальную вакуумную систему) с раствором ЭДТА или цитрата натрия в качестве антикоагулянта. После взятия крови пробирку следует несколько раз плавно перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом. (В противном случае кровь свернется и экстракция ДНК станет невозможной!). После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив.

Допускается хранение образцов:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 6 часов с момента получения материала;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 суток.

Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

#### Спинальная жидкость (ликвор)

Спинальную жидкость (ликвор) получают с помощью одноразовых игл, в одноразовые пластиковые сухие пробирки объемом 1,5 мл в количестве не менее 1,0 мл.

Допускается хранение образцов спинномозговой жидкости (ликвора):

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Пунктат из лимфатических узлов получают с помощью стерильного шприца и разливают в одноразовые пластиковые сухие пробирки объемом 1,5 мл.

Допускается хранение образцов образцов пунктатов лимфатических узлов:

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 1 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 2 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

#### Мазки (соскобы) со слизистой оболочки ротоглотки

Мазки забирать сухими стерильными ватными тампонами на

пластиковой основе вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) поместить в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда в транспортную среду, аккуратно обломить пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части и оставить рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал с рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Допускается хранение образцов мазков со слизистой оболочки ротоглотки:

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 1 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 2 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

#### Мазки (соскобы) со слизистой оболочки носа

Мазки забирать сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой основе. Тампон ввести легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем тампон слегка опустить книзу, ввести в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, сделать вращательное движение и удалить вдоль наружной стенки носа. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) поместить в стерильную одноразовую пробирку с защелкивающейся крышкой, содержащую соответствующую транспортную среду, и аккуратно обломить пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части и оставить рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал с рабочей

части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Допускается хранение образцов мазков со слизистой оболочки носа:

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 1 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 2 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

#### Мазки с конъюнктивы

Материал забирать сухим стерильным ватным тампоном на пластиковой основе под местной анестезией (2 капли раствора декаина). Оттянув нижнее веко, вращающими движениями провести зонд 4-5 раз по конъюнктиве, захватывая внешний и внутренний углы глаза. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) поместить в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда в транспортную среду, аккуратно обломить пластиковый стержень и оставить рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал с рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Допускается хранение образцов мазков с конъюнктивы:

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 1 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 2 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание

материала.

#### Амниотическая жидкость (околоплодные воды)

Взятие амниотической жидкости производится при проведении амниоцентеза с помощью одноразовых игл, в одноразовые пластиковые стерильные сухие пробирки объемом 1,5 мл в количестве не менее 1,0 мл

Допускается хранение образцов амниотической жидкости (околоплодных вод):

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

#### Аутопсийный материал и плацента

Материал следует забирать из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, из поврежденной ткани или из пограничного с повреждением участка.

Кусочки ткани диаметром не более 5 мм следует поместить в одноразовые стерильные пробирки объемом 1,5 мл содержащие 0,1 мл транспортной среды. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки.

Кусочки ткани диаметром более 5 мм помещают в одноразовые стерильные флаконы с широким горлом и завинчивающейся крышкой объемом 50 мл.

Допускается хранение образцов аутопсийного материала, плаценты:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

#### Мазки со слизистой оболочки влагалища

Взятие материала провести с помощью зонда-тампона или универсального зонда в пробирку с транспортной средой из

заднебокового свода влагалища. Рабочей частью зонда вращательным движением провести по поверхности боковых стенок влагалища, максимально полно собирая отделяемое. Материал из влагалища взять в достаточном количестве. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови. Зонд перенести в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал с рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать. В случае использования транспортной среды с муколитиком ее цвет может измениться за счет изменения pH (при кислом pH отделяемого).

Допускается хранение образцов мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища:

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 1 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 2 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

### Моча

Для ПЦР-исследования отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 20-30 мл в специальный сухой стерильный флакон или контейнер на 50-60 мл.

Допускается хранение образцов мочи:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.



## Грудное молоко

Взятие грудного молока производится в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые стерильные флаконы с широким горлом и завинчивающейся крышкой объемом 50 мл.

Допускается хранение образцов грудного молока:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

## Меконий и фекалии

Меконий и фекалии следует забирать в небольшом количестве (4-6 раз) из нескольких мест одноразовой лопаточкой прикрепленной к крышке флакона, в который забирают материал.

Допускается хранение образцов:

- при комнатной температуре - в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С - в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С. – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

## Концентраты образцов воды

Забор образцов воды производится в одноразовые стерильные флаконы с завинчивающейся крышкой объемом 50 мл.

Допускается хранение образцов:

- при комнатной температуре – в течение 1 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Жидкие среды для первичного обогащения продукта питания в соответствии с МУК 4.2.2872-11 «Методы выявления и идентификации патогенных бактерий-возбудителей инфекционных заболеваний с пищевым путем передачи в продуктах питания на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией»;

Допускается хранение образцов жидких сред для первичного обогащения продукта питания:

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 1 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 2 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

## **ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК**

Образцы пунктатов лимфатических узлов, мазков из респираторного тракта, мазков с конъюнктивы, мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища и жидких сред для первичного обогащения продукта питания предварительной подготовки не требуют.

Образцы цельной крови и цельной пуповинной крови требуют предварительной подготовки. В пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл внести 1,0 мл гемолитика (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) и 0,25 мл крови. Аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе и оставить на 10 мин, периодически перемешивая. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 4 тыс g (например, 8 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin) в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, не задевая осадка. После отмывки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов). При необходимости можно повторить отмывку гемолитиком. Полученный осадок лейкоцитов должен быть немедленно лизирован (в случае выделения «РИБО-преп» добавить 300 мкл лизирующего раствора и в последующем выделить ДНК в соответствии с инструкцией к набору реагентов «РИБО-преп», не добавляя лизирующий раствор повторно) или заморожен при температуре не выше минус 68 °С на длительное время.

Образцы спинномозговой жидкости (ликвора) требуют предварительной подготовки.

Отобрать, используя наконечник с фильтром, 1 мл материала и перенести в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Центрифугировать 5 мин при 10 тыс g (например, 12 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin). После проведения центрифугирования надосадочную жидкость аккуратно отобрать, оставив 100 мкл надосадочной жидкости, затем ресуспендировать материал на вортексе.

Допускается хранение осадка спинномозговой жидкости в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 мес – при температуре от минус 24 до минус 16 °С, длительное хранение – при температуре не выше минус 68 °С.

Образцы амниотической жидкости (околоплодных вод) требуют предварительной подготовки. Образец амниотической жидкости тщательно ресуспендировать на вортексе. Отобрать, используя наконечник с фильтром, 1 мл материала и перенести в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Центрифугировать 10 мин при 10 тыс g (например, 12 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin). После проведения центрифугирования надосадочную жидкость аккуратно отобрать, используя наконечник с фильтром, оставляя над осадком 100 мкл жидкости, затем ресуспендировать материал на вортексе.

Допускается хранение предобработанного материала в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 мес – при температуре от минус 24 до минус 16 °С, длительное хранение – при температуре не выше минус 68 °С.

Образцы грудного молока требуют предварительной подготовки. Образец грудного молока перемешать пипетированием. Отобрать, используя наконечник с фильтром, 1 мл материала и перенести в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Центрифугировать 5 мин при 10 тыс g (например, 12 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin). Супернатант аккуратно отобрать, оставляя 100 мкл надосадочной жидкости, и ресуспендировать материал на вортексе. Допускается хранение осадка грудного молока в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 мес – при температуре от минус 24 до минус 16 °С, длительное хранение – при температуре не выше минус 68 °С.

Образцы мочи требуют предварительной подготовки. Флакон с мочой взболтать. Перенести 1 мл мочи, используя

наконечник с фильтром, в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Центрифугировать 5 минут при 10 тыс g (например, 12 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin). При наличии большого количества солей ресуспендировать только верхний слой осадка солей в объеме 1 мл и затем снова концентрировать. Используя вакуумный отсасыватель с колбой ловушкой, полностью удалить супернатант, не захватывая осадок. К осадку добавить «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)» до конечного объема 0,2 мл, тщательно перемешать содержимое на вортексе.

Допускается хранение предварительно обработанных образцов мочи до проведения ПЦР-исследования в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 мес – при температуре от минус 24 до минус 16 °С, длительное хранение – при температуре не выше минус 68 °С.

Образцы мекония и фекалий требуют предварительной подготовки. В стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл внести 0,8 мл фосфатного буфера (стерильного изотонического раствора натрия хлорида). В пробирку отдельным наконечником с аэрозольным барьером внести 0,1 г (0,1 мл) мекония/фекалий и тщательно ресуспендировать на вортексе до образования гомогенной суспензии. Пробирку с суспензией (водянистым меконием/фекалиями) центрифугировать 5 минут при 7-12 тыс g (например, 10-13 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin). Отдельным наконечником с аэрозольным барьером отобрать 0,05 мл бактериальной фракции мекония/фекалий (верхняя бело-желтая часть образовавшегося осадка). При отсутствии осадка или бело-желтого пограничного слоя между осадком и супернатантом отбирать 0,1 мл со дна пробирки или с границы осадка и супернатанта соответственно. Отобранную часть пробы, содержащую высокую концентрацию бактерий, перенести в пробирку, содержащую 0,8 мл фосфатного буфера (стерильного изотонического раствора натрия хлорида). Тщательно ресуспендировать осадок на вортексе и центрифугировать на микроцентрифуге 5 минут при 7-12 тыс g (например, 10-13 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin). Супернатант удалить, добавить 0,3 мл фосфатного буфера

(стерильного изотонического раствора натрия хлорида) и ресуспендировать осадок на вортексе.

Образцы аутопсийного материала и плаценты требуют предварительной подготовки. Аутопсийный материал, плаценту (кусочки ткани диаметром более 5 мм) поместить в стерильную ступу и измельчить пестиком. В полученный гомогенат добавить стерильный изотонический раствор натрия хлорида и тщательно перемешать. Полученную суспензию использовать для экстракции ДНК. Аутопсийный материал, плацента (кусочки ткани диаметром не более 5 мм), помещенные в пробирки, содержащие транспортную среду, предварительной подготовки не требуют.

Допускается хранение образцов при комнатной температуре – в течение 6 часов; при температуре от 2 до 8°C – в течение 3 суток; при температуре от минус 24 до минус 16°C – в течение 1 недели; при температуре не выше минус 68 °C – длительно.

Концентраты образцов воды предварительной подготовки не требуют. В случае наличия в исследуемом образце видимых примесей или видимой глазом окраски, данную пробу непосредственно перед анализом тщательно перемешать, перенести в пробирки объемом 1,5-2,0 мл и центрифугировать на микроцентрифуге в течение 1 мин при 10 тыс g (например, 12 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin). Надосадочную жидкость использовать для экстракции ДНК.

Допускается хранение материала не более 1 сут. при температуре от 2 до 8 °C и длительно при температуре не выше минус 68 °C.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

## **ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА**

Использование для проведения ПЦР-исследования биологического материала, содержащего избыточное количество примесей в виде слизи, крови, гноя и др. может приводить к ингибированию реакции амплификации. Для контроля эффективности экстракции ДНК и возможного ингибирования ПЦР в наборе реагентов предусмотрено

использование внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО STI-87, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Непригодными для исследования являются:

- образцы цельной крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке;
- образцы мочи, собранные ранее 24 часов от момента доставки в лабораторию.

## **ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ**

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».
- анализ и интерпретация результатов.

## **ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ**

Для экстракции ДНК из разных видов исследуемого материала используются комплекты реагентов:

- «РИБО-преп» для экстракции ДНК из цельной крови, цельной пуповинной крови, спинномозговой жидкости (ликвора), пунктатов лимфатических узлов, мазков из респираторного тракта, мазков с конъюнктивы, амниотической жидкости (околоплодных вод), мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища, мочи, грудного молока, мекония, фекалий, жидких сред для первичного обогащения продукта питания, объектов окружающей среды (концентратов образцов воды) в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.
- «ДНК-сорб-С» для экстракции ДНК из плаценты и аутопсийного материала в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплектов реагентов «РИБО-преп» и «ДНК-сорб-С»:

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО STI-87**.

Объем ВКО STI-87 – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (**ОК**) внести **100 мкл ОКО**.

В пробирку положительного контроля экстракции (**ПК**) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО *Listeria monocytogenes***.

Объем элюции – **50 мкл**.

## ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN)

### СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN для амплификации фрагментов ДНК *L. monocytogenes* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном и количественном формате. Комплект реагентов включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>Listeria monocytogenes</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
К1 LIM	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К2 LIM	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПКО <i>Listeria monocytogenes</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

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

### АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

#### А. Подготовка пробирок для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию



требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL *Listeria monocytogenes*** и **5 мкл ПЦР-буфера-Н**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на одну реакцию. Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице**, приведенной в **Приложении 1**.

**ВНИМАНИЕ!** Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесь-FL *Listeria monocytogenes***. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-FL *Listeria monocytogenes***, **ПЦР-буфером-Н**, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL *Listeria monocytogenes*** и **ПЦР-буфера-Н**, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов. Тип пробирок выбрать в зависимости от используемого прибора.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
7. Поставить контрольные реакции:  
Для качественного определения ДНК:
  - а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К-**;
  - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл ДНК-калибратора К2 LIM**.
  - в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.

- г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО *Listeria monocytogenes***.

Для количественного определения ДНК:

- а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К-**;
- б) **ДНК-калибратор К1** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл К1 LIM**
- в) **ДНК-калибратор К2** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл К2 LIM**.
- г) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.
- д) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО *Listeria monocytogenes***.

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

## **Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»**

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 9).

Таблица 9

**Единая программа амплификации и детекции  
флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов  
роторного<sup>5</sup> и планшетного<sup>6</sup> типов**

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество повторов
1	50	15 мин	-	1
2	95	15 мин	-	1
3	95	10 с	-	45
	60	20 с	<b>FAM, JOE, ROX</b>	

**ВНИМАНИЕ!** С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

**ВНИМАНИЕ!** В случае неполной загрузки приборов планшетного типа необходимо дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

**В. Анализ и интерпретация результатов**

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с

<sup>5</sup> Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

<sup>6</sup> Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем каналам:

Таблица 10

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
<b>При исследовании цельной крови, цельной пуповинной крови, плаценты, мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища, пунктатов лимфатических узлов и аутопсийного материала</b>			
Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО STI-87	ДНК <i>Listeria monocytogenes</i>	ДНК ВКО Glob
<b>При исследовании амниотической жидкости (околоплодных вод), грудного молока, спинномозговой жидкости (ликвора), мазков из респираторного тракта, мазков с конъюнктивы, мочи, мекония, фекалий, жидких сред для первичного обогащения продукта питания и концентратов образцов воды</b>			
Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО STI-87	ДНК <i>Listeria monocytogenes</i>	Не учитывается

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла ( $C_t$ ) в соответствующей графе таблицы результатов.

**При проведении качественного исследования** принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 11

**Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов при проведении качественного ПЦР-исследования**

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)			Результат
FAM	JOE	ROX	
<b>При исследовании цельной крови, цельной пуповинной крови, плаценты, мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища, пунктатов лимфатических узлов и аутопсийного материала</b>			
определено меньше граничного	отсутствует	определено меньше граничного	ДНК <i>L. monocytogenes</i> <b>НЕ обнаружена</b>
<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	ДНК <i>L. monocytogenes</i> <b>обнаружена</b>
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	<b>Невалидный*</b>
определено меньше граничного	определено больше граничного	определено меньше граничного	<b>Сомнительный**</b>
<b>При исследовании амниотической жидкости (околоплодных вод), грудного молока, спинномозговой жидкости (ликвора), мазков из респираторного тракта, мазков с конъюнктивы, мочи, мекония, фекалий, жидких сред для первичного обогащения продукта питания и концентратов образцов воды</b>			
определено меньше граничного	отсутствует	-	ДНК <i>L. monocytogenes</i> <b>НЕ обнаружена</b>
<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	-	ДНК <i>L. monocytogenes</i> <b>обнаружена</b>
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	-	<b>Невалидный*</b>
определено меньше граничного	определено больше граничного	-	<b>Сомнительный**</b>

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

\*\* В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным. При получении

отрицательного результата в повторной постановке образец считать сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

**ВНИМАНИЕ!** Граничные значения  $C_t$  указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

**Результат качественного ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 12 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.**

Таблица 12

**Результаты для контролей различных этапов качественного ПЦР-исследования**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора, $C_t$		
		FAM	JOE	ROX
<b>При исследовании цельной крови, цельной пуповинной крови, плаценты, мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища, пунктатов лимфатических узлов и аутопсийного материала</b>				
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
ОК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	Отсутствует или определено больше граничного
К-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
<b>При исследовании амниотической жидкости (околоплодных вод), грудного молока, спинномозговой жидкости (ликвора), мазков из респираторного тракта, мазков с конъюнктивы, мочи, мекония, фекалий, жидких сред для первичного обогащения продукта питания и концентратов образцов воды</b>				
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	–
ОК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	–
К-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	–
К+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	–

**При проведении количественного исследования на основании полученных значений порогового цикла ( $C_t$ ) и**

исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов К1 и К2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений копий ДНК *L. monocytogenes*, ДНК человека и ВКО STI-87 в 1 мл исследуемых и контрольных образцов. Полученные значения используются для расчета количества ДНК *L. monocytogenes* в 1 мл образца согласно формуле:

$$\text{число копий ДНК } L. monocytogenes \text{ в 1 мл} \times A = \text{копий/мл}$$

где: **A** – коэффициент, учитывающий объем экстракции, рассчитывается по формуле:

$$\text{Коэффициент } A = \frac{100}{\text{объем экстракции (мкл)}}$$

**ВНИМАНИЕ!** Значения концентраций калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 13

### Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении количественного ПЦР-исследования

Результат	Интерпретация
<b>При исследовании цельной крови, цельной пуповинной крови, плаценты, мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища, пунктатов лимфатических узлов и аутопсийного материала</b>	
Невалидный	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора FAM отсутствует или определено больше граничного, а по каналу для флуорофора ROX определено больше граничного при этом рассчитанные значения концентраций ДНК <i>L. monocytogenes</i> находятся в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. Если значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора ROX отсутствует, повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование.
ДНК <i>L. monocytogenes</i> не выявлена	Значение <i>Ct</i> для ДНК <i>L. monocytogenes</i> отсутствует, а по каналу для флуорофора ROX и FAM определено значение <i>Ct</i> меньше граничного. Результат выдается как <b>ДНК <i>Listeria monocytogenes</i> не выявлена.</b>
<b>При исследовании амниотической жидкости (околоплодных вод), грудного молока, спинномозговой жидкости (ликвора), мазков из респираторного тракта, мазков с конъюнктивы, мочи, мекония, фекалий, жидких сред для первичного обогащения продукта питания и концентратов образцов воды</b>	
Невалидный	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора FAM отсутствует или определено больше граничного, при этом рассчитанные

	значения концентраций ДНК <i>L. monocytogenes</i> находятся в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
ДНК <i>L. monocytogenes</i> не выявлена	Значение <i>Ct</i> для ДНК <i>L. monocytogenes</i> отсутствует, а по каналу для флуорофора FAM определено значение <i>Ct</i> меньше граничного. Результат выдается как <b>ДНК <i>Listeria monocytogenes</i> не выявлена.</b>
менее 1x10 <sup>3</sup> копий/мл	ДНК <i>L. monocytogenes</i> выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как <b>результат менее 1x10<sup>3</sup> копий ДНК <i>Listeria monocytogenes</i>/мл.</b>
Xx10 <sup>y</sup> копий/мл	Расчитанное значение концентрации (копий/мл) находится в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как <b>ДНК <i>Listeria monocytogenes</i> выявлена в концентрации Xx10<sup>y</sup> копий/мл.</b>
более 1x10 <sup>8</sup> копий/мл	ДНК <i>L. monocytogenes</i> выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как <b>результат более 1x10<sup>8</sup> копий ДНК <i>Listeria monocytogenes</i>/мл.</b>

**ВНИМАНИЕ!** Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат количественного ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 14 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.



Таблица 14

**Результаты для контролей различных этапов  
количественного ПЦР-исследования**

Конт- роль	Контролируе- мый этап ПЦР- исследования	Результаты амплификации по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
<b>При исследовании цельной крови, цельной пуповинной крови, плаценты, мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища, пунктатов лимфатических узлов и аутопсийного материала</b>				
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного; значение концентрации укладывается в диапазон	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного
ОК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного	значение <i>Ct</i> отсутствует	Отсутствует или определено значение <i>Ct</i> больше граничного
К–	ПЦР	значение <i>Ct</i> отсутствует	значение <i>Ct</i> отсутствует	значение <i>Ct</i> отсутствует
К1	ПЦР	<u>определено</u> значение <i>Ct</i>	<u>определено</u> значение <i>Ct</i>	<u>определено</u> значение <i>Ct</i>
К2	ПЦР	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного
<b>При исследовании амниотической жидкости (околоплодных вод), грудного молока, спинномозговой жидкости (ликвора), мазков из респираторного тракта, мазков с конъюнктивы, мочи, мекония, фекалий, жидких сред для первичного обогащения продукта питания и концентратов образцов воды</b>				
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного; значение концентрации укладывается в диапазон	-
ОК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного	значение <i>Ct</i> отсутствует	-
К–	ПЦР	значение <i>Ct</i> отсутствует	значение <i>Ct</i> отсутствует	-
К1	ПЦР	<u>определено</u> значение <i>Ct</i>	<u>определено</u> значение <i>Ct</i>	-
К2	ПЦР	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного	-

**Возможные ошибки:**

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла ( $C_t$ ) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
2. Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла ( $C_t$ ) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции ДНК, для всех образцов.
3. При проведении количественного ПЦР-исследования рассчитанная концентрация ПКО *Listeria monocytogenes* не укладывается в диапазон, указанный во вкладыше, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
4. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла ( $C_t$ ), а по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла ( $C_t$ ) меньше граничного. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемого микроорганизма, начиная с этапа экстракции ДНК.
5. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX определено значение порогового цикла ( $C_t$ ). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемого микроорганизма.
6. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора К1 отсутствует значение порогового цикла ( $C_t$ ) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров

(см. табл. 14). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.

При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора K2 значение порогового цикла ( $C_t$ ) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 14) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.

7. При проведении количественного ПЦР-исследования коэффициент корреляции  $R^2$  при построении калибровочной прямой менее 0,98. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
8. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

## ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 2 (комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 и «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN)

### СОСТАВ

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 для выделения РНК/ДНК из клинического материала – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Количество
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета <sup>7</sup>	15	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на экстракцию ДНК из 50 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN для амплификации фрагментов ДНК *L. monocytogenes* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном и количественном формате. Комплект реагентов включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>Listeria monocytogenes</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
K1 LIM	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K2 LIM	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

<sup>7</sup> При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Реактив	Описание	Объем, мл	Количество
ПКО <i>Listeria monocytogenes</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

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

## АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

### А. Подготовка пробирок для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL *Listeria monocytogenes*** и **5 мкл ПЦР-буфера-Н**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на одну реакцию. Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице**, приведенной в **Приложении 1**.

**ВНИМАНИЕ!** Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесь-FL *Listeria monocytogenes***. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-FL *Listeria monocytogenes***, **ПЦР-буфером-Н**, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL *Listeria monocytogenes*** и **ПЦР-буфера-Н**, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов

для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов. Тип пробирок выбрать в зависимости от используемого прибора.

5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

7. Поставить контрольные реакции:

Для качественного определения ДНК:

- а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К-**;
- б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл ДНК-калибратора К2 LIM**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.
- г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО *Listeria monocytogenes***.

Для количественного определения ДНК:

- а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К-**;
- б) **ДНК-калибратор К1** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл К1 LIM**
- в) **ДНК-калибратор К2** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл К2 LIM**.
- г) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.
- д) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО *Listeria monocytogenes***.

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

## Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 15).

Таблица 15

### Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного<sup>8</sup> и планшетного<sup>9</sup> типов

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество повторов
1	50	15 мин	-	1
2	95	15 мин	-	1
3	95	10 с	-	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX	

**ВНИМАНИЕ!** С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

**ВНИМАНИЕ!** В случае неполной загрузки приборов планшетного типа необходимо дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с

<sup>8</sup> Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

<sup>9</sup> Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

детекцией флуоресцентного сигнала.

- По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

## В. Анализ и интерпретация результатов

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем каналам:

Таблица 16

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
<b>При исследовании цельной крови, цельной пуповинной крови, плаценты, мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища, пунктатов лимфатических узлов и аутопсийного материала</b>			
Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО STI-87	ДНК <i>Listeria monocytogenes</i>	ДНК ВКО Glob
<b>При исследовании амниотической жидкости (околоплодных вод), грудного молока, спинномозговой жидкости (ликвора), мазков из респираторного тракта, мазков с конъюнктивы, мочи, мекония, фекалий, жидких сред для первичного обогащения продукта питания и концентратов образцов воды</b>			
Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО STI-87	ДНК <i>Listeria monocytogenes</i>	Не учитывается

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

**При проведении качественного исследования** принцип интерпретации результатов следующий:



Таблица 17

**Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов при проведении качественного ПЦР-исследования**

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)			Результат
FAM	JOE	ROX	
<b>При исследовании цельной крови, цельной пуповинной крови, плаценты, мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища, пунктатов лимфатических узлов и аутопсийного материала</b>			
определено меньше граничного	отсутствует	определено меньше граничного	ДНК <i>L. monocytogenes</i> <b>НЕ обнаружена</b>
определено меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	определено меньше граничного	ДНК <i>L. monocytogenes</i> <b>обнаружена</b>
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	<b>Невалидный*</b>
определено меньше граничного	определено больше граничного	определено меньше граничного	<b>Сомнительный**</b>
<b>При исследовании амниотической жидкости (околоплодных вод), грудного молока, спинномозговой жидкости (ликвора), мазков из респираторного тракта, мазков с конъюнктивы, мочи, мекония, фекалий, жидких сред для первичного обогащения продукта питания и концентратов образцов воды</b>			
определено меньше граничного	отсутствует	-	ДНК <i>L. monocytogenes</i> <b>НЕ обнаружена</b>
определено меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	-	ДНК <i>L. monocytogenes</i> <b>обнаружена</b>
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	-	<b>Невалидный*</b>
определено меньше граничного	определено больше граничного	-	<b>Сомнительный**</b>

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

\*\* В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец

считать сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

**ВНИМАНИЕ!** Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

**Результат качественного ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 18 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.**

Таблица 18

**Результаты для контролей различных этапов  
качественного ПЦР-исследования**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора, <i>Ct</i>		
		FAM	JOE	ROX
<b>При исследовании цельной крови, цельной пуповинной крови, плаценты, мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища, пунктатов лимфатических узлов и аутопсийного материала</b>				
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
ОК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	Отсутствует или определено больше граничного
К-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
<b>При исследовании амниотической жидкости (околоплодных вод), грудного молока, спинномозговой жидкости (ликвора), мазков из респираторного тракта, мазков с конъюнктивы, мочи, мекония, фекалий, жидких сред для первичного обогащения продукта питания и концентратов образцов воды</b>				
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	–
ОК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	–
К-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	–
К+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	–

**При проведении количественного исследования** на основании полученных значений порогового цикла (*Ct*) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений копий ДНК *L. monocytogenes*, ДНК человека и ВКО STI-87 в 1 мл исследуемых и контрольных образцов. Полученные значения используются для расчета количества ДНК *L. monocytogenes* в 1 мл образца согласно формуле:

$$\text{число копий ДНК } L. monocytogenes \text{ в 1 мл} \times A = \text{копий/мл}$$

где: **A** – коэффициент, учитывающий объем экстракции, рассчитывается по формуле:

$$\text{Коэффициент } A = \frac{100}{\text{объем экстракции (мкл)}}$$

**ВНИМАНИЕ!** Значения концентраций калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 19

### Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении количественного ПЦР-исследования

Результат	Интерпретация
При исследовании цельной крови, цельной пуповинной крови, плаценты, мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища, пунктатов лимфатических узлов и аутопсийного материала	
Невалидный	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора FAM отсутствует или определено больше граничного, а по каналу для флуорофора ROX определено больше граничного, при этом рассчитанные значения концентраций ДНК <i>L. monocytogenes</i> находятся в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. Если значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора ROX отсутствует, необходимо повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование.
ДНК <i>L. monocytogenes</i> не выявлена	Значение <i>Ct</i> для ДНК <i>L. monocytogenes</i> отсутствует, а по каналу для флуорофора ROX и FAM определено значение <i>Ct</i> меньше граничного. Результат выдается как <b>ДНК <i>Listeria monocytogenes</i> не выявлена.</b>
При исследовании амниотической жидкости (околоплодных вод), грудного молока, спинномозговой жидкости (ликвора), мазков из респираторного тракта, мазков с конъюнктивы, мочи, мекония, фекалий, жидких сред для первичного обогащения продукта питания и концентратов образцов воды	

Невалидный	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора FAM отсутствует или определено больше граничного, при этом рассчитанные значения концентраций ДНК <i>L. monocytogenes</i> находятся в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
ДНК <i>L. monocytogenes</i> не выявлена	Значение <i>Ct</i> для ДНК <i>L. monocytogenes</i> отсутствует, а по каналу для флуорофора FAM определено значение <i>Ct</i> меньше граничного. Результат выдается как <b>ДНК <i>Listeria monocytogenes</i> не выявлена.</b>
менее $1 \times 10^3$ копий/мл	ДНК <i>L. monocytogenes</i> выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как <b>результат менее <math>1 \times 10^3</math> копий ДНК <i>Listeria monocytogenes</i>/мл.</b>
$X \times 10^Y$ копий/мл	Рассчитанное значение концентрации (копий/мл) находится в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как <b>ДНК <i>Listeria monocytogenes</i> выявлена в концентрации <math>X \times 10^Y</math> копий/мл.</b>
более $1 \times 10^8$ копий/мл	ДНК <i>L. monocytogenes</i> выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как <b>результат более <math>1 \times 10^8</math> копий ДНК <i>Listeria monocytogenes</i>/мл.</b>

**ВНИМАНИЕ!** Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

**Результат количественного ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 20 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.**

Таблица 20

**Результаты для контролей различных этапов количественного ПЦР-исследования**

Конт-роль	Контролируе-мый этап ПЦР-исследования	Результаты амплификации по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
<b>При исследовании цельной крови, цельной пуповинной крови, плаценты, мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища, пунктатов лимфатических узлов и аутопсийного материала</b>				
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение $C_t$ меньше граничного	<u>определено</u> значение $C_t$ меньше граничного; значение концентрации укладывается в диапазон	<u>определено</u> значение $C_t$ меньше граничного
ОК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение $C_t$ меньше граничного	значение $C_t$ отсутствует	Отсутствует или определено значение $C_t$ больше граничного
К-	ПЦР	значение $C_t$ отсутствует	значение $C_t$ отсутствует	значение $C_t$ отсутствует
К1	ПЦР	<u>определено</u> значение $C_t$	<u>определено</u> значение $C_t$	<u>определено</u> значение $C_t$
К2	ПЦР	<u>определено</u> значение $C_t$ меньше граничного	<u>определено</u> значение $C_t$ меньше граничного	<u>определено</u> значение $C_t$ меньше граничного
<b>При исследовании амниотической жидкости (околоплодных вод), грудного молока, спинномозговой жидкости (ликвора), мазков из респираторного тракта, мазков с конъюнктивы, мочи, мекония, фекалий, жидких сред для первичного обогащения продукта питания и концентратов образцов воды</b>				
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение $C_t$ меньше граничного	<u>определено</u> значение $C_t$ меньше граничного; значение концентрации укладывается в диапазон	-
ОК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение $C_t$ меньше граничного	значение $C_t$ отсутствует	-
К-	ПЦР	значение $C_t$ отсутствует	значение $C_t$ отсутствует	-
К1	ПЦР	<u>определено</u> значение $C_t$	<u>определено</u> значение $C_t$	-
К2	ПЦР	<u>определено</u> значение $C_t$ меньше граничного	<u>определено</u> значение $C_t$ меньше граничного	-

**Возможные ошибки:**

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла ( $C_t$ ) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
2. Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла ( $C_t$ ) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции ДНК, для всех образцов.
3. При проведении количественного ПЦР-исследования рассчитанная концентрация ПКО *Listeria monocytogenes* не укладывается в диапазон, указанный во вкладыше, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
4. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла ( $C_t$ ), а по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла ( $C_t$ ) меньше граничного. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемого микроорганизма, начиная с этапа экстракции ДНК.
5. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX определено значение порогового цикла ( $C_t$ ). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемого микроорганизма.
6. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора К1 отсутствует значение порогового цикла ( $C_t$ ) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров

(см. табл. 20). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.

При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора K2 значение порогового цикла ( $C_t$ ) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 20) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.

7. При проведении количественного ПЦР-исследования коэффициент корреляции  $R^2$  при построении калибровочной прямой менее 0,98. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
8. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

## ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 3 (комплект реагентов «ДНК-сорб-С» вариант 50 и «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN)

### СОСТАВ

Комплект реагентов «ДНК-сорб-С» вариант 50 для выделения ДНК из клинического материала **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Количество
Буфер для лизирующего реагента	Прозрачная бесцветная жидкость <sup>10</sup>	20	1 флакон
Лизирующий реагент	Прозрачная бесцветная жидкость	0,85	1 пробирка
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость <sup>10</sup>	15	1 флакон
Раствор для отмывки 2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на экстракцию ДНК из 50 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN для амплификации фрагмента ДНК *L. monocytogenes* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном и количественном формате. Комплект реагентов включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>Listeria monocytogenes</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
К1 LIM	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К2 LIM	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПКО <i>Listeria monocytogenes</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

<sup>10</sup> При хранении буфера для лизирующего реагента и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.



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

## **АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

### **А. Подготовка пробирок для амплификации**

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL *Listeria monocytogenes*** и **5 мкл ПЦР-буфера-Н**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на одну реакцию. Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице**, приведенной в **Приложении 1**.

**ВНИМАНИЕ!** Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесь-FL *Listeria monocytogenes***. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-FL *Listeria monocytogenes***, **ПЦР-буфером-Н**, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество ПЦР-смеси-FL *Listeria monocytogenes* и ПЦР-буфера-Н, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов. Тип пробирок выбрать в зависимости от используемого прибора.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной

реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

7. Поставить контрольные реакции:

Для качественного определения ДНК:

а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К-**;

б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл ДНК-калибратора К2 LIM**.

в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО *Listeria monocytogenes***.

Для количественного определения ДНК:

а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К-**;

б) **ДНК-калибратор К1** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл К1 LIM**

в) **ДНК-калибратор К2** – в две пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл К2 LIM**.

г) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

д) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ПКО *Listeria monocytogenes***.

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

## **Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»**

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения

соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 21).

Таблица 21

**Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного<sup>11</sup> и планшетного<sup>12</sup> типов**

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество повторов
1	50	15 мин	-	1
2	95	15 мин	-	1
3	95	10 с	-	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX	

**ВНИМАНИЕ!** С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

**ВНИМАНИЕ!** В случае неполной загрузки приборов планшетного типа необходимо дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

<sup>11</sup> Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

<sup>12</sup> Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

## В. Анализ и интерпретация результатов

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем каналам:

Таблица 22

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
При исследовании цельной крови, цельной пуповинной крови, плаценты, мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища, пунктатов лимфатических узлов и аутопсийного материала			
Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО STI-87	ДНК <i>Listeria monocytogenes</i>	ДНК ВКО Glob
При исследовании амниотической жидкости (околоплодных вод), грудного молока, спинномозговой жидкости (ликвора), мазков из респираторного тракта, мазков с конъюнктивы, мочи, мекония, фекалий, жидких сред для первичного обогащения продукта питания и концентратов образцов воды			
Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО STI-87	ДНК <i>Listeria monocytogenes</i>	Не учитывается

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла ( $C_t$ ) в соответствующей графе таблицы результатов.

**При проведении качественного исследования** принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 23

**Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов при проведении качественного ПЦР-исследования**

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)			Результат
FAM	JOE	ROX	
<b>При исследовании цельной крови, цельной пуповинной крови, плаценты, мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища, пунктатов лимфатических узлов и аутопсийного материала</b>			
определено меньше граничного	отсутствует	определено меньше граничного	ДНК <i>L. monocytogenes</i> <b>НЕ обнаружена</b>
определено меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	определено меньше граничного	ДНК <i>L. monocytogenes</i> <b>обнаружена</b>
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	<b>Невалидный*</b>
определено меньше граничного	определено больше граничного	определено меньше граничного	<b>Сомнительный**</b>
<b>При исследовании амниотической жидкости (околоплодных вод), грудного молока, спинномозговой жидкости (ликвора), мазков из респираторного тракта, мазков с конъюнктивы, мочи, мекония, фекалий, жидких сред для первичного обогащения продукта питания и концентратов образцов воды</b>			
определено меньше граничного	отсутствует	-	ДНК <i>L. monocytogenes</i> <b>НЕ обнаружена</b>
определено меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	-	ДНК <i>L. monocytogenes</i> <b>обнаружена</b>
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	-	<b>Невалидный*</b>
определено меньше граничного	определено больше граничного	-	<b>Сомнительный**</b>

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

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

образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец считать сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

**ВНИМАНИЕ!** Граничные значения  $C_t$  указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

**Результат качественного ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 24 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.**

Таблица 24

**Результаты для контролей различных этапов  
качественного ПЦР-исследования**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора, $C_t$		
		FAM	JOE	ROX
<b>При исследовании цельной крови, цельной пуповинной крови, плаценты, мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища, пунктатов лимфатических узлов и аутопсийного материала</b>				
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
ОК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	Отсутствует или определено больше граничного
К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
<b>При исследовании амниотической жидкости (околоплодных вод), грудного молока, спинномозговой жидкости (ликвора), мазков из респираторного тракта, мазков с конъюнктивы, мочи, мекония, фекалий, жидких сред для первичного обогащения продукта питания и концентратов образцов воды</b>				
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	–
ОК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	–
К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	–
К+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	–

**При проведении количественного исследования** на основании полученных значений порогового цикла (*Ct*) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений копий ДНК *L. monocytogenes*, ДНК человека и ВКО STI-87 в 1 мл исследуемых и контрольных образцов. Полученные значения используются для расчета количества ДНК *L. monocytogenes* в 1 мл образца согласно формуле:

$$\text{число копий ДНК } L. monocytogenes \text{ в 1 мл} \times A = \text{копий/мл}$$

где: **A** – коэффициент, учитывающий объем экстракции, рассчитывается по формуле:

$$\text{Коэффициент } A = \frac{100}{\text{объем экстракции (мкл)}}$$

**ВНИМАНИЕ!** Значения концентраций калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 25

### Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении количественного ПЦР-исследования

Результат	Интерпретация
<b>При исследовании цельной крови, цельной пуповинной крови, плаценты, мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища, пунктатов лимфатических узлов и аутопсийного материала</b>	
Невалидный	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора FAM отсутствует или определено больше граничного, а по каналу для флуорофора ROX определено больше граничного при этом рассчитанные значения концентраций ДНК <i>L. monocytogenes</i> находятся в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК. Если значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора ROX отсутствует, необходимо повторно провести взятие биологического материала и ПЦР-исследование.
ДНК <i>L. monocytogenes</i> не выявлена	Значение <i>Ct</i> для ДНК <i>L. monocytogenes</i> отсутствует, а по каналу для флуорофора ROX и FAM определено значение <i>Ct</i> меньше граничного. Результат выдается как <b>ДНК <i>Listeria monocytogenes</i> не выявлена.</b>
<b>При исследовании амниотической жидкости (околоплодных вод), грудного молока, спинномозговой жидкости (ликвора), мазков из респираторного тракта, мазков с конъюнктивы, мочи, мекония, фекалий, жидких сред для</b>	

<b>первичного обогащения продукта питания и концентратов образцов воды</b>	
Невалидный	Значение $C_t$ по каналу для флуорофора FAM отсутствует или определено больше граничного, при этом рассчитанные значения концентраций ДНК <i>L. monocytogenes</i> находятся в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
ДНК <i>L. monocytogenes</i> не выявлена	Значение $C_t$ для ДНК <i>L. monocytogenes</i> отсутствует, а по каналу для флуорофора FAM определено значение $C_t$ меньше граничного. Результат выдается как <b>ДНК <i>Listeria monocytogenes</i> не выявлена.</b>
менее $1 \times 10^3$ копий/мл	ДНК <i>L. monocytogenes</i> выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как <b>результат менее <math>1 \times 10^3</math> копий ДНК <i>Listeria monocytogenes</i>/мл.</b>
$X \times 10^Y$ копий/мл	Рассчитанное значение концентрации (копий/мл) находится в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как <b>ДНК <i>Listeria monocytogenes</i> выявлена в концентрации <math>X \times 10^Y</math> копий/мл.</b>
более $1 \times 10^8$ копий/мл	ДНК <i>L. monocytogenes</i> выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как <b>результат более <math>1 \times 10^8</math> копий ДНК <i>Listeria monocytogenes</i>/мл.</b>

**ВНИМАНИЕ!** Граничные значения  $C_t$  указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

**Результат количественного ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 26 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.**



Таблица 26

**Результаты для контролей различных этапов  
количественного ПЦР-исследования**

Конт- роль	Контролируемый этап ПЦР- исследования	Результаты амплификации по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
<b>При исследовании цельной крови, цельной пуповинной крови, плаценты, мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища, пунктатов лимфатических узлов и аутопсийного материала</b>				
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного; значение концентрации укладывается в диапазон	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного
ОК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного	значение <i>Ct</i> отсутствует	Отсутствует или определено значение <i>Ct</i> больше граничного
К–	ПЦР	значение <i>Ct</i> отсутствует	значение <i>Ct</i> отсутствует	значение <i>Ct</i> отсутствует
К1	ПЦР	<u>определено</u> значение <i>Ct</i>	<u>определено</u> значение <i>Ct</i>	<u>определено</u> значение <i>Ct</i>
К2	ПЦР	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> не больше граничного	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> не больше граничного	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> не больше граничного
<b>При исследовании амниотической жидкости (околоплодных вод), грудного молока, спинномозговой жидкости (ликвора), мазков из респираторного тракта, мазков с конъюнктивы, мочи, мекония, фекалий, жидких сред для первичного обогащения продукта питания и концентратов образцов воды</b>				
ПК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного; значение концентрации укладывается в диапазон	-
ОК	Экстракция ДНК	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного	значение <i>Ct</i> отсутствует	-
К–	ПЦР	значение <i>Ct</i> отсутствует	значение <i>Ct</i> отсутствует	-
К1	ПЦР	<u>определено</u> значение <i>Ct</i>	<u>определено</u> значение <i>Ct</i>	-
К2	ПЦР	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного	<u>определено</u> значение <i>Ct</i> меньше граничного	-

**Возможные ошибки:**

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла ( $C_t$ ) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
2. Для положительного контроля экстракции (ПК) значение порогового цикла ( $C_t$ ) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа экстракции ДНК, для всех образцов.
3. При проведении количественного ПЦР-исследования рассчитанная концентрация ПКО *Listeria monocytogenes* не укладывается в диапазон, указанный во вкладыше, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
4. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла ( $C_t$ ), а по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла ( $C_t$ ) меньше граничного. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемого микроорганизма, начиная с этапа экстракции ДНК.
5. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX определено значение порогового цикла ( $C_t$ ). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемого микроорганизма.
6. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора К1 отсутствует значение порогового цикла ( $C_t$ ) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров

(см. табл. 26). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.

При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора K2 значение порогового цикла ( $C_t$ ) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 26) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.

7. При проведении количественного ПЦР-исследования коэффициент корреляции  $R^2$  при построении калибровочной прямой менее 0,98. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
8. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

## **СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ**

**Срок годности.** 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

**Транспортирование.** Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

### **Хранение.**

Форма комплектации 1. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-Н и ПЦР-смеси-FL *Listeria monocytogenes*. ПЦР-буфер-Н, ПЦР-смесь-FL *Listeria monocytogenes* хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *Listeria monocytogenes* хранить в защищенном от света месте.

Форма комплектации 2. Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-Н и ПЦР-смеси-FL *Listeria monocytogenes*. ПЦР-буфер-Н, ПЦР-смесь-FL *Listeria monocytogenes* хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *Listeria monocytogenes* хранить в защищенном от света месте.

Форма комплектации 3. Комплект реагентов «ДНК-сорб-С» вариант 50 хранить при температуре от 2 до 25 °С, кроме лизирующего реагента. Лизирующий реагент хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-Н и ПЦР-смеси-FL *Listeria monocytogenes*. ПЦР-буфер-Н, ПЦР-смесь-FL *Listeria monocytogenes* хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *Listeria monocytogenes* хранить в защищенном от света месте.

## ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов, требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Listeria monocytogenes*-скрин/монитор-FL» направлять в отдел рекламаций, организации обучения и контроля качества по адресу 115035, г. Москва, ул. Садовническая, д. 20/13, стр. 2 (тел. (495) 664-28-84, факс (495) 664-28-89, e-mail: cs@ilslab.ru)<sup>13</sup>

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение в отдел по работе с рекламациями по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

<sup>13</sup> Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru).

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

### Схема приготовления реакционных смесей для ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»

объем реагентов на одну реакцию, мкл			10,0	5,0
число исследуемых образцов			Объем реагентов на указанное количество реакций	
для количественного определения	для качественного определения	Количество реакций *	ПЦР-смесь-1-FL <i>Listeria monocytogenes</i>	ПЦР-буфер-Н
1	4	9	90	45
2	5	10	100	50
3	6	11	110	55
4	7	12	120	60
5	8	13	130	65
6	9	14	140	70
7	10	15	150	75
8	11	16	160	80
9	12	17	170	85
10	13	18	180	90
11	14	19	190	95
12	15	20	200	100
13	16	21	210	105
14	17	22	220	110
15	18	23	230	115
16	19	24	240	120
17	20	25	250	125
18	21	26	260	130
19	22	27	270	135
20	23	28	280	140
21	24	29	290	145
22	25	30	300	150
23	26	31	310	155
24	27	32	320	160
25	28	33	330	165
30	33	34	340	170

\* Для количественного определения: количество реакций = количество исследуемых образцов + контроли этапа экстракции (ОК, ПК) и ПЦР (ДНК-калибраторы К1 LIM, К2 LIM по два повтора, К-) + запас на один образец. (N+7+1, где N- количество исследуемых образцов).

Для качественного определения: количество реакций = количество исследуемых образцов + контроли этапа экстракции (ОК, ПК) и ПЦР (ДНК-калибратор К2 LIM, К-) +

запас на один образец.  $(N+4+1)$ , где N-количество исследуемых образцов).

## СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

**REF**

Номер в каталоге



Максимальное  
число тестов

**LOT**

Код партии



Использовать до

**IVD**

Изделие для in vitro  
диагностики



Обратитесь к  
руководству по  
эксплуатации

**VER**

Дата изменения



Не допускать  
попадания  
солнечного света



Ограничение  
температуры



Дата  
изготовления



Производитель