



Регистрационное удостоверение  
№ ФСР 2010/06931 от 01 ноября 2024 года



В данном вкладыше приведена информация для набора реагентов *Listeria monocytogenes* в фасовке S.  
Перед началом работы изучите инструкцию.

## Набор реагентов для выявления ДНК *Listeria monocytogenes* методом полимеразной цепной реакции

### *Listeria monocytogenes*

**REF**

**R1-P003-23/4 (Фасовка S, пробирки, «Real-time»)**

**R1-P003-S3/4 (Фасовка S, стрипы<sup>1</sup>, «Real-time»)**

**F1-P003-51/2 (Фасовка S, пробирки 0,5 mL, «Flash»)**

### Информация о наборе реагентов

#### Назначение:

Набор реагентов предназначен для выявления ДНК *Listeria monocytogenes* в биологическом материале человека (кровь; соскобы со слизистых; спинномозговая жидкость; амниотическая жидкость; биоптат или пунктат из очагов поражения органов и тканей; фекалии или меконий) методом ПЦР.

Набор реагентов *Listeria monocytogenes* выпускается в следующих вариантах исполнения:

- ПЦР с детекцией в режиме реального времени (маркируется - «Real-time»);
- ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке (маркируется - «Flash»).

**Выделение ДНК<sup>2</sup>:** рекомендуются наборы/комплекты реагентов для выделения НК ПРОБА-РАПИД, ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС, ПРОБА ОПТИМА, ПРОБА-МЧ-РАПИД, ПРОБА-МЧ МАКС (ООО «ДНК-Технология ТС»).

Примечание – Комплект реагентов ПРОБА-РАПИД не рекомендуется для выделения ДНК из соскобов из уrogenитального тракта у мужчин.

**Время проведения анализа (включая пробоподготовку):** от 2 часов (в зависимости от количества образцов и используемого набора/комплекта реагентов для выделения ДНК).

**Количество анализируемых образцов:** 48 определений для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» и 50 определений для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке», включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов, положительных контрольных образцов и фоновых пробирок. Для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» предусмотрено не более 12 постановок, для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» - не более 5 постановок.

### Состав набора реагентов:

Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок		Номинальный объём компонента
		«Flash»	«Real-time»	
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	50 пробирок	48 пробирок или 6 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1 пробирка	500 мкл
ПЦР-буфер (фон)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	-	200 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец <sup>3</sup>	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1 пробирка	75 мкл
Крышки для стрипов <sup>4</sup>		6 шт.		

Т а б л и ц а 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam/Green	Hex/Yellow/Vic	Rox/Orange	Cy5/Red	Cy5.5/Crimson
<i>Listeria monocytogenes</i>	BK	-	-	-

<sup>1</sup> - не используется для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q

<sup>2</sup> - возможность использования набора/комплекта реагентов для выделения ДНК определяется видом биологического материала

<sup>3</sup> - на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «K+»

<sup>4</sup> - входит в состав набора реагентов при расфасовке смеси для амплификации, запечатанной парафином, в стрипы

## Проведение анализа

### 1 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

#### ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

2. При использовании набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы» следует строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

**1.1** Промаркируйте по одной пробирке/стрипованной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого неизвестного образца, для отрицательного контрольного образца (К-) и для положительного контрольного образца (К+). При использовании набора реагентов в варианте исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» промаркируйте дополнительно две пробирки «ФОН» для контроля фона флуоресценции.

**ВНИМАНИЕ!** Количество реагентов рассчитано не более чем на 12 постановок при условии переменного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 1 положительного контрольного образца в каждой постановке (вариант исполнения «Real-time») или не более чем на 5 постановок при условии переменного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца, 1 положительного контрольного образца и 2 пробирок «ФОН» (вариант исполнения «Flash») в каждой постановке.

Пример:

Необходимо проанализировать 4 образца. Для этого нужно:

- ПЦР с детекцией в режиме реального времени (Real-time): промаркировать 4 пробирки для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 6.
- ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке (Flash): промаркировать 4 пробирки для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-», одну пробирку для «К+», две пробирки «ФОН». Общее количество пробирок – 8.

**1.2** Встряхните пробирку с раствором Taq-полимеразы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

**1.3** Добавьте во все промаркированные пробирки (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Taq-полимеразы. Добавьте в пробирки, промаркированные «ФОН», по 10 мкл ПЦР-буфера (фон).

**ВНИМАНИЕ!** При использовании для проведения ПЦР детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q минеральное масло в пробирки не вносится!

**1.4** Добавьте в каждую пробирку (при необходимости) по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте пробирки/стрипы.

**1.5** Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

#### ВНИМАНИЕ!

1. Перед внесением в пробирки с реакционной смесью препарата ДНК и отрицательного контрольного образца необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения ДНК.

2. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-ДНК, ПРОБА-РАПИД, ПРОБА-ГС (только в случае, если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки) встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

3. При использовании для выделения ДНК наборов реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД и ПРОБА-МЧ МАКС необходимо, не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с, затем поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, следует встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

4. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. В случае использования стрипов следует закрывать крышку стрипа после внесения в него образцов перед началом работы со следующим. Закрывайте пробирки/стрипы плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

**1.6** Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки, промаркированные «К-», «К+» и «ФОН», ДНК не вносится.

**1.7** Внесите в пробирки, промаркированные «К-» и «ФОН», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

Примечание – Готовые нормировочные пробирки «ФОН» допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии набора реагентов при условии использования того же набора/комплекта реагентов для выделения ДНК. Нормировочные пробирки следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение одного месяца. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (от 18 °С до 25 °С), для этого за один час до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

**1.8** Внесите в пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца.

**1.9** Центрифугируйте все пробирки/стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с (при использовании для проведения ПЦР детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q центрифугирование не обязательно).

**1.10** Установите все пробирки/стрипы в программируемый термостат/амплификатор или в детектирующий амплификатор.

**1.11** Для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке»:

Проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, в режиме, приведённом в таблице 2.

Таблица 2 – Программа ампликации для амплификаторов с активным регулированием (например, программируемый термостат Терцик)

№ п.п.	Температура, °C	Время		Количество циклов
		мин	с	
1	94,0	1	00	1
2	94,0	0	05	5
	64,0	0	05	
	67,0	0	05	
3	94,0	0	01	40
	64,0	0	05	
	67,0	0	05	
4	10,0	...	...	Хранение

Примечание – Более подробное описание программирования и управления программируемым термостатом «Терцик» содержится в руководстве по эксплуатации прибора (см. «Руководство пользователя»).

**1.12** Для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени»:

Для детектирующих амплификаторов серии ДТ:

Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест<sup>1</sup>. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок/стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

**1.13** Для детектирующих амплификаторов Rotor-Gene Q, CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5:

Проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, по программам ампликации, приведённым в таблицах 4, 5, 6 соответственно.

Таблица 3 – Программа ампликации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	10 <sup>2</sup>	...	...	Хранение		Хранение

√ - режим оптических измерений

Таблица 4 – Программа ампликации для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q

№ / Cycling	Температура, °C / Temperature	Время, с / Hold Time, s	Количество циклов / Cycle Repeats
Cycling	80 deg	60	1 time
	94 deg	90	
Cycling 2	94 deg	30	5 times
	57 deg √	15	
Cycling 3	94 deg	10	45 times
	57 deg √	15	

√ - режим оптических измерений, установить измерение флуоресценции (Acquiring) по каналам детекции Green (Fam) и Yellow (Hex) при 57 °C

<sup>1</sup> - тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении А инструкции по применению) или предоставляется производителем набора реагентов

<sup>2</sup> - допускается хранение при температуре 25 °C

Таблица 5 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов CFX96

№ блока (Step)	Температура, °C	Время, мин: сек	Количество циклов (повторов)
1	80	01:00	1
2	94	01:30	1
3	94	0:15	50
4	64 ✓	0:20	

✓ - режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по необходимым каналам детекции (Fam, Hex) при 64 °C

Таблица 6 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов Applied Biosystems QuantStudio 5

Стадия	№ шага	Температура, °C	Время, мин: сек	Количество циклов (повторов)
Стадия удержания	1	80	01:00	1
	2	94	01:30	1
Стадия ПЦР	1	94	0:20	50
	2	64 ✓	0:20	

✓ - сбор данных для необходимых флуорофоров (Fam, Vic (Hex)) включен

## 2 Регистрация и учёт результатов ПЦР

проводятся автоматически программным обеспечением для детектирующих амплификаторов.

При использовании детектирующих амплификаторов CFX96 следует использовать регрессионный тип анализа (Cq Determination Mode: Regression), во вкладке «Baseline Subtraction» необходимо выбрать «Baseline Subtraction Curve Fit».

Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 7. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

Таблица 7 – Интерпретация результатов ПЦР

Flash	Real-time		Интерпретация результата
Результат, полученный на флуоресцентном детекторе «ДЖИН» или «ДЖИН-4»	Канал детекции Fam/Green (искомая ДНК), Cp/Cq/Ct	Канал детекции Hex/Yellow/Vic (внутренний контроль), Cp/Cq/Ct	
<b>Неизвестные образцы</b>			
«+»	Указан	Не учитывается	<b>Обнаружена ДНК <i>Listeria monocytogenes</i> («+»)</b>
«-»	Не указан	Указан	Не обнаружена ДНК <i>Listeria monocytogenes</i> («-»)
«нд»	Не указан	Не указан	Недостовверный результат («нд»)
<b>Отрицательный контрольный образец</b>			
«-»	Не указан	Указан	<b>Отрицательный результат («-»)</b> Результаты постановки валидны
<b>Положительный контрольный образец</b>			
«+»	Указан	Не учитывается	<b>Положительный результат («+»)</b> Результаты постановки валидны

## Условия транспортирования, хранения и эксплуатации

Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.

Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °C до 25 °C не более 5 суток.

Все компоненты набора реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °C до 8 °C в течение всего срока годности набора реагентов. Смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в защищённом от света месте.

Срок годности набора реагентов - 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обращаться в службу клиентской поддержки.

Служба клиентской поддержки: 8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).

E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru