



## ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов «ПЦР-ЛИСТЕРИОЗ-ФАКТОР» для выявления ДНК возбудителя листериоза (*Listeria monocytogenes*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени**

ТУ 21.10.60-367-51062356-2022

Для диагностики *in vitro*

## Содержание

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Список сокращений .....                                                                                                             | 3  |
| 1. Назначение .....                                                                                                                 | 4  |
| 2. Характеристика набора .....                                                                                                      | 4  |
| 2.2 Состав набора .....                                                                                                             | 4  |
| 3. Аналитические характеристики.....                                                                                                | 6  |
| 4. Меры предосторожности.....                                                                                                       | 6  |
| 5. Материалы и оборудование .....                                                                                                   | 7  |
| 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб .....                                                            | 8  |
| 6.2 Подготовка исследуемых проб .....                                                                                               | 9  |
| 7. Проведение анализа .....                                                                                                         | 10 |
| 7.1 Экстракция (выделение) НК из исследуемых проб .....                                                                             | 10 |
| 7.2 Подготовка образцов к проведению ПЦР .....                                                                                      | 10 |
| 7.3 Проведение реакции ПЦР РВ с флуоресцентной детекцией .....                                                                      | 11 |
| 8. Интерпретация результатов анализа .....                                                                                          | 11 |
| 9. Условия транспортирования .....                                                                                                  | 13 |
| 10. Условия хранения .....                                                                                                          | 13 |
| 11. Срок годности .....                                                                                                             | 13 |
| Приложение 1. Порядок работы на приборах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) ..... | 14 |
| Приложение 2. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия) .....                                                        | 19 |
| Анализ результатов амплификации .....                                                                                               | 20 |
| Приложение 3. Порядок работы на приборе CFX96 (Bio-Rad, США) .....                                                                  | 21 |
| Приложение 4. Порядок работы на приборе LightCycler® 96 .....                                                                       | 23 |
| Приложение 5. Лист вносимых изменений .....                                                                                         | 31 |

## Список сокращений

|        |                                                                                   |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| ВКО    | внутренний контрольный образец                                                    |
| К-     | отрицательный контроль                                                            |
| ВК-    | отрицательный контроль этапа экстракции                                           |
| К+     | положительный контроль                                                            |
| ОКО    | отрицательный контрольный образец                                                 |
| ПКО    | положительный контрольный образец                                                 |
| ПЦР РВ | полимеразная цепная реакция с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени |
| ДНК    | дезоксирибонуклеиновая кислота                                                    |
| НК     | нуклеиновая кислота                                                               |
| СП     | санитарные правила                                                                |
| МУ     | методические указания                                                             |

## **1. Назначение**

Набор предназначен для выявления ДНК возбудителя листериоза (*Listeria monocytogenes*) в биологическом материале от животных (цельная кровь, истечения из половых органов абортировавшего животного, истечения из носа и глаз, молоко, моча, фекалии; от абортированных плодов и павших животных материал выбирают в зависимости от формы болезни: фрагмент плаценты, паренхиматозных органов или головного мозга, содержимое желудка/брюшной полости), а также в мясо-молочных продуктах, кормах растительного и животного происхождения, клещах (переносчиках), культурах микроорганизмов, смывах с поверхностей методом амплификации ДНК с флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

## **2. Характеристика набора**

### **2.1 Принцип действия**

Набор позволяет специфически амплифицировать фрагмент генома *Listeria monocytogenes* и ДНК внутреннего положительного контроля (бактериофага Т4) в мультиплексной полимеразной цепной реакции. Детекция продуктов амплификации осуществляется в режиме реального времени с использованием принципа выщепления флуоресцентной метки на 5' конце олигонуклеотидного зонда.

### **2.2 Состав набора**

Набор состоит из комплекта реагентов для проведения мультиплексной ПЦР (комплект № 1) и комплекта контрольных образцов (комплект № 2). Набор выпускается в двух вариантах:

- 1) Для анализа 55 образцов (включая контрольные образцы);
- 2) Для анализа 110 образцов (включая контрольные образцы).

Состав набора приведен в Таблицах 1 и 2.

Протокол выходного контроля доступен по запросу.

Таблица 1. Комплект №1 для проведения ПЦР:

| № | Состав комплекта                                       | Описание                              | Объем, мкл    |                | Кол-во |
|---|--------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------|----------------|--------|
|   |                                                        |                                       | На 55 реакций | На 110 реакций |        |
| 1 | Смесь для проведения ПЦР,<br><b>ПЦР СМЕСЬ LISTERIA</b> | прозрачная бесцветная жидкость*       | 275           | 550            | 1      |
| 2 | Буфер для проведения ПЦР,<br><b>ПЦР БУФЕР LISTERIA</b> | прозрачная бесцветная жидкость        | 550           | 1100           | 1      |
| 3 | ДНК Полимераза,<br><b>TAQ POLYMERASE</b>               | прозрачная бесцветная вязкая жидкость | 30            | 60             | 1      |
| 4 | Буфер для разведения ДНК,<br><b>ДНК БУФЕР</b>          | Прозрачная бесцветная жидкость        | 500           | 1000           | 1      |

Таблица 2. Комплект №2 контрольные образцы:

| № | Состав комплекта                                                        | Описание                        | Объем, мкл    |                | Кол-во |
|---|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------|----------------|--------|
|   |                                                                         |                                 | на 55 реакций | на 110 реакций |        |
| 1 | Внутренний контрольный образец,<br><b>ВКО Т1</b>                        | Прозрачная бесцветная жидкость* | 550           | 1100           | 1      |
| 2 | Отрицательный контрольный образец,<br><b>ОКО (ТЕ буфер)<sup>2</sup></b> | Прозрачная бесцветная жидкость  | 1500          | 2000           | 1      |
| 3 | Положительный контрольный образец,<br><b>ПКО LISTERIA</b>               | Прозрачная бесцветная жидкость  | 100           | 200            | 1      |

В набор не входят реактивы для экстракции нуклеиновых кислот. Выделение ДНК может проводиться, например, с помощью наборов на основе сорбционного метода, в состав которых входит силика или микроцентрифужные

---

\* Возможна легкая опалесценция

<sup>2</sup> Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

колонки, и также наборов на основе фенол-хлороформной экстракции и т.п. Рекомендуется использовать набор «ДНК/РНК-С-ФАКТОР» либо аналогичный.

Для экстракции ДНК из продуктов и изделий животного происхождения, а также из кормов, кормовых и пищевых добавок рекомендуется использовать комплект реагентов «ДНК-ПЛАНТ-ФАКТОР» (или аналогичный).

### 3. Аналитические характеристики

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении ДНК других микроорганизмов: вирус классической чумы свиней; вирус болезни Ауэски; цирковир свиней 2-го типа; парвовирус свиней; вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней; вирус эпидемической диареи свиней; ротавирус; вирус репродуктивно- респираторного синдрома свиней; *Bordetella bronchiseptica*; *Brucella suis*; *Campylobacter jejuni*; *Campylobacter coli*, *Escherichia coli*; *Listeria monocytogenes*; *Listeria welshimeri*, *Listeria grayi*, *Salmonella Dublin*; *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Clostridium perfringens*; *Chlamydia suis*; *Haemophilus parasuis*; *Klebsiella pneumoniae*; *Leptospira interrogans*; *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pasterella multocida*; *Pseudomonas aeruginosa*.

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении образцов ДНК свиньи, КРС, собаки и человека.

### 4. Меры предосторожности

Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб биологического материала от животных осуществлять в строгом соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и с требованиями Приказа №651 Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 23.09.2021 г. «Об утверждении Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов листериоза».

Исследование проводится в два этапа в двух отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое.

Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники с аэрозольным барьером.

Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) сбрасывают в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор (например, 0,2% натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты).

Рабочие поверхности в ПЦР помещениях облучают УФ светом в течение 30 минут до начала и после проведения работ. Также после окончания работ рекомендуется обрабатывать рабочие поверхности дезинфицирующим раствором.

## **5. Материалы и оборудование**

### **Для зоны выделения ДНК из исследуемых проб:**

- Настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВп-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия);
- Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл с диапазоном температур от 25 до 99 °С (например, ТТ-2-«Термит» «НПО ДНК-Технология» Россия);
- Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
- Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс. об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия);
- Вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 20-200 и 200-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 1,5 мл (например, «Tarsons», Индия);
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и 1000 мкл в штативах (например, «Tarsons», Индия);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Штативы для микропробирок на 1,5-2 мл (например, «Ахуген», США);
- Емкость с дезинфицирующим средством;
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от -24 до -18 °С.;
- Халат лабораторный;
- Набор для выделения ДНК (см. пункт 2.2).

### **Для зоны проведения ПЦР анализа:**

- Амплификатор (например «Rotor-Gene Q», Qiagen; «ДТ-96», ДНК-технология; «CFX96», Biorad).
- ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», Ламинарные системы, Россия).
- Микроцентрифуга-вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 2-20, 20-200 мкл и 100-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).

- Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 20, 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Axygen», США).
- Штативы для наконечников (например, «Axygen», США) и микропробирок на 0,2 мл (например, «SSI», США).
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от -24 до -18 °С;
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 0,2 и 1,5 мл (например, «Axygen», США);
- Штативы для микропробирок на 0,2 и 1,5-2,0 мл (например, «SSI», США);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Халат лабораторный.

## **6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб**

### **6.1 Отбор материала для исследования, транспортировка и хранение**

Для исследования используют следующий материал:

- Цельная кровь. Кровь забирается в пробирку с 6 % ЭДТА из расчета 50 мкл раствора ЭДТА на 1 мл крови, закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.
- Мочу отбирают в количестве 10 – 20 мл в специальный сухой стерильный флакон или контейнер.
- Молоко, отбирают в объеме 10-30 мл в стерильную посуду.
- Истечения из носа и глаз, истечения из половых органов абортировавших маток снимают с помощью стерильного зонда, зонд помещают в пластиковую микропробирку объемом 1,5 мл с 0,5 мл стерильного физиологического раствора.
- Паренхиматозные органы, головной мозг, содержимое брюшной полости и абортированного плода отбирают в стерильный контейнер.
- Фекалии отбирают в стерильный контейнер.
- Пробы кормов, творога отбирают в количестве 10-20 г.
- Культуры микроорганизмов в жидких средах отбирают в стерильную тару.
- Бактериальные колонии ресуспендируют в 0,5 мл физиологического раствора.
- Питательные среды отбирают в стерильную тару (твердые ресуспендируют в физиологическом растворе).
- Смывы с поверхностей (внутрилабораторных, с поверхностей тары, кормушек, мест содержания животных и др.) отбирают в стерильную тару с 0,5 мл физиологического раствора.

Полученные образцы можно транспортировать и хранить в следующих режимах:

- при температуре от 2 до 8°С – в течение суток;
- при температуре не выше минус 20°С – в течение месяца;
- при температуре не выше минус 68°С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

*На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.*

## **6.2 Подготовка исследуемых проб**

Пробы цельной крови, истечения из носа и глаз, истечения из половых органов, культуры микроорганизмов и питательные среды, смывы с поверхностей используют для выделения ДНК без предварительной подготовки. Смывы с поверхностей, взятые для проверки наличия внутрилабораторной контаминации, выделять не нужно.

Мочу после сбора отстаивают в течение 1 часа, затем осторожно сливают, оставляя придонную часть – около 10 мл. Центрифугируют при 5000-6000 g 10 мин, если осадок практически не виден, то в эту же пробирку вносят еще 10 мл материала и повторяют центрифугирование. Надосадочную жидкость осторожно сливают, оставив над осадком примерно 0,2 мл жидкости. Осадок ресуспендируют в оставшейся надосадочной жидкости и 100 мкл его используют для экстракции НК. До получения осадка мочу нельзя охлаждать или замораживать. Если нет возможности исследовать мочу в течение 24 ч после взятия, в образец вносят глицерин (в количестве 10% от объема пробы), перемешивают и замораживают.

Молоко в объеме до 10 мл центрифугируют при 3 тыс об/мин в течение 10-15 мин. Надосадочную жидкость осторожно отбирают, оставив над осадком примерно 0,2 мл жидкости. Осадок ресуспендируют в оставшейся надосадочной жидкости и 0,1 мл суспензии используют для выделения ДНК.

Исследуемые пробы тканей, органов, мясных продуктов, головного мозга, паренхиматозных органов, плодовых оболочек (небольшие кусочки до 1 г весом), планценты размером 1х1х1, клещей (одного или нескольких экземпляров) гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматических гомогенизаторов, затем обычно готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Смесь отстаивают при комнатной температуре в течение 15-30 мин, после чего верхнюю фазу переносят в пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и 100 мкл ее используют для экстракции ДНК.

Из фекалий готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе. Взвесь фекалий декантируют в течении 5-10 минут. Отбирают 1 мл надосадочной жидкости и переносят в чистую пробирку 1,5 мл, центрифугируют при 5000 об./мин на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf, в течение 5 мин. Экстракцию НК из осветленного экстракта фекалий проводят по возможности, сразу.

Исследуемые пробы кормов, сухих кормовых и пищевых добавок гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматических гомогенизаторов. Далее пробы отбирают в одноразовые пластиковые пробирки (емкостью 1,5 мл) в количестве 30 - 100 мг (что соответствует объему 30-50 мкл в градуированной пробирке) и используют в

выделение («ДНК-ПЛАНТ-ФАКТОР» или аналогичные). При использовании набора реагентов, не предназначенного для выделения НК из кормов (напр., «ДНК/РНК-С-ФАКТОР»), допускается экстракция из 100 мкл 10% суспензии образца – в таком случае перед экстракцией суспензию необходимо центрифугировать при 2000 об./мин 5-10 мин.

При необходимости исследуемый материал следует обогатить в соответствии с действующей нормативно-методической документацией (например, МУК 4.2872-11 «Методы выявления и идентификации патогенных бактерий - возбудителей инфекционных заболеваний с пищевым путем передачи в продуктах питания на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией»).

*На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.*

## 7. Проведение анализа

Исследование с помощью набора реагентов «ПЦР-ЛИСТЕРИОЗ-ФАКТОР» состоит из трех этапов:

- экстракция НК;
- проведение реакции ПЦР РВ;
- учет результатов анализа.

### 7.1 Экстракция (выделение) НК из исследуемых проб

Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный контроль выделения. Внести во все пробирки с исследуемыми образцами, включая пробирку для **ОКО**, по 10 мкл **ВКО Т1**.

Внести исследуемые пробы в объеме согласно инструкции к набору для выделения НК, в пробирку отрицательного контроля выделения вместо исследуемой пробы внести **ОКО<sup>3</sup> (пробирку обозначить как ВК-)**.

Выделять ДНК из анализируемых и контрольных образцов согласно протоколу инструкции производителя набора для выделения НК.

Выделенную ДНК можно хранить в течение одной недели при температуре от 2°C до 8°C или в течение года при температуре не выше -16°C.

### 7.2 Подготовка образцов к проведению ПЦР

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

Успешное прохождение реакции контролируют использованием **ПКО LISTERIA, ВКО Т1** и ДНК буфера.

---

<sup>3</sup> Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

**Примечание.** Допускается размораживание реагентов из набора перед работой при температуре не выше 40°C (с использованием термостата). **Прогревание пробирки TAQ POLYMERASE категорически запрещено.**

В отдельной пробирке смешать компоненты набора из расчета на каждую реакцию:

**5 мкл ПЦР СМЕСЬ LISTERIA;**

**10 мкл смеси ПЦР БУФЕР LISTERIA;**

**0,5 мкл TAQ POLYMERASE**

Перемешать смесь на вортексе и сбросить капли кратковременным центрифугированием.

Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб. Внести по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.

Используя наконечники с фильтром в подготовленные пробирки внести:

а) в пробирку отрицательного контроля ПЦР (К-) 10 мкл ДНК буфера;

б) в ряд пробирок для исследуемых проб - в каждую внести по 10 мкл ДНК соответствующей пробы, полученной по п.7.1 (включая пробу ВК-);

в) в пробирку положительный контроль ПЦР (К+) – 10 мкл ПКО LISTERIA.

**Примечание.** При использовании для работы амплификаторов с считыванием через крышку, **запрещается наносить маркировку на крышку пробирок!**

В случае использования приборов планшетного типа («ДТ-96», «CFX96», LightCycler® 96 и прочие) необходимо стряхнуть капли со стенок пробирок (или плашек) кратким центрифугированием).

### **7.3 Проведение реакции ПЦР РВ с флуоресцентной детекцией**

Параметры температурно-временного режима амплификации на приборах «Rotor-Gene Q», «ДТ-96», «CFX96» и LightCycler® 96 указаны в Приложениях 1, 2, 3 и 4 Инструкции соответственно.

Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ячейки амплификатора. Программировать прибор согласно инструкции производителя и в соответствии с Приложениями 1, 2, 3 и 4 Инструкции.

В случае использования амплификаторов других моделей рекомендуется консультация со специалистом компании «ВЕТ ФАКТОР».

После завершения программы амплификации отработанные пробирки утилизируют в соответствии с МУ 1.3. 2569 -09.

### **8. Интерпретация результатов анализа**

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени» в соответствии с

инструкцией производителя к прибору и в соответствии с Приложениями 1, 2,3 и 4 Инструкции.

Учет результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца).

Результат считается достоверным в случае корректного прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции ДНК в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа.

| Проба                       | Канал детекции            |                                        | Результат                                                                                               |
|-----------------------------|---------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                             | ROX/Orange                | FAM/Green                              |                                                                                                         |
|                             | <i>LISTERIA</i>           | <i>BKO</i>                             |                                                                                                         |
| <b>ПКО<br/>К+</b>           | До 31                     | до 31                                  | Реакции положительного и внутреннего контролей <b>прошли успешно</b>                                    |
| <b>ДНК<br/>буфер<br/>К-</b> | Сигнал отсутствует        | Сигнал отсутствует                     | Реакция <b>прошла успешно</b>                                                                           |
|                             | Любое значение            | Сигнал отсутствует                     | Специфическая контаминация!<br><b>ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка!</b><br>Рекомендуется поставить смывы  |
|                             | Сигнал отсутствует        | Любое значение                         | Контаминация ВКО! <b>ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка!</b><br>Рекомендуется поставить смывы               |
| <b>ОКО<br/>ВК-</b>          | Сигнал отсутствует        | Любое значение от 1 до 35              | Экстракция <b>прошла успешно</b>                                                                        |
|                             | Любое значение            | Сигнал отсутствует или любое значение  | Специфическая контаминация!<br><b>ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!</b><br>Рекомендуется поставить смывы. |
|                             | Сигнал отсутствует        | Сигнал отсутствует или значение Ct >35 | Результат недостоверный, возможно присутствие ингибиторов.<br><b>ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!</b>    |
| <b>Образцы</b>              | Любое значение от 1 до 35 | Сигнал отсутствует или любое значение  | Результат анализа <b>положительный. ДНК <i>Listeria monocytogenes</i> присутствует</b>                  |
|                             | Сигнал отсутствует        | Любое значение от 1 до 35              | Результат анализа <b>отрицательный</b>                                                                  |
|                             | Сигнал отсутствует        | Сигнал отсутствует или значение Ct >35 | Результат не достоверный.<br><b>ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!</b>                                     |

В случае, если в ВК- значение Ct для ВКО отсутствует или превышает граничное, а в К+ значение Ct для ВКО менее граничного (и в образцах Ct для ВКО менее граничного) – результаты можно считать достоверными. Также в

случае если значение Ct для ВКО в К+ отсутствует или превышает граничное, а в ВК- и образцах менее граничного – результаты можно считать достоверными.

Если для исследуемого образца по каналу **ROX/Orange** значение **Ct** определяется **позднее 35 цикла** при корректном прохождении положительных и отрицательных контролей – он считается спорным и исследуется повторно с этапа выделения ДНК. Если при повторной постановке наблюдается схожий результат (**Ct** на канале **ROX/Orange** более 35), требуется повторное взятие материала от того же животного для проведения ПЦР-исследования и (или) использование альтернативных методов диагностики.

При исследовании образцов пищевой продукции (пробы кормов, творога т.п.) допустимо получение значения **Ct** на канале **ROX/Orange** больше 35 из-за низкого содержания ДНК *Listeria monocytogenes*. В случае получения такого результата, требуется повторить исследование с этапа экстракции ДНК. В случае получения при повторном исследовании образца результата (даже если значение **Ct** на канале **ROX/Orange** больше 35) образец считать положительным (**ДНК *Listeria monocytogenes* присутствует**).

**ВНИМАНИЕ!** При получении сомнительных результатов, а также при появлении любого значения Ct для отрицательного контроля этапа ПЦР К- (на любом из каналов) рекомендуется исследование смывов с поверхностей в лаборатории для исключения риска внутрилабораторной контаминации. Смывы с лабораторных поверхностей и оборудования используют в качестве матрицы для ПЦР (вносят в реакцию вместо исследуемых проб в количестве 10 мкл) – то есть смывы исследуют без экстракции. Появление любого значения Ct на любом из каналов свидетельствует о внутрилабораторной контаминации.

## 9. Условия транспортирования

Набор «ПЦР-ЛИСТЕРИОЗ-ФАКТОР» можно транспортировать всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

## 10. Условия хранения

Длительное хранение комплектов набора «ПЦР-ЛИСТЕРИОЗ-ФАКТОР» осуществляют при температуре от минус 18 до минус 20°С.

Перед началом работы с набором компоненты набора следует разукomплектовать и хранить в соответствии со следующими требованиями:

- 1) Комплект №1 (см. Табл. 1) при температуре от минус 18 до минус 20°С;
- 2) Комплект №2 (см. Табл. 2) при температуре от 2 до 8°С.

## 11. Срок годности

Срок годности реагентов «ПЦР-ЛИСТЕРИОЗ-ФАКТОР» 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

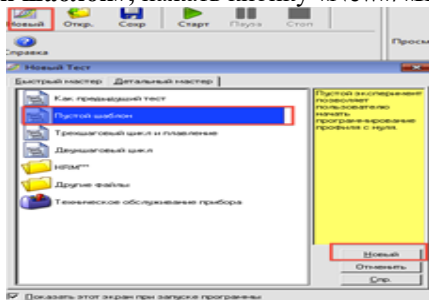
## Приложение 1. Порядок работы на приборах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия)

В случае первого использования ПЦР-набора на приборе необходимо создать протокол с названием «ПЦР-ЛИСТЕРИОЗ-ФАКТОР» (при дальнейшей работе используют созданный шаблон).

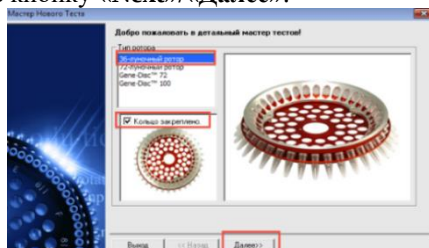
При работе с прибором Rotor-Gene 3000 используют программу Rotor-Gene версии 6 или выше, с приборами Rotor-Gene6000и Rotor-GeneQ– используют программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build67) или выше.

Термины, соответствующие разным версиям программного обеспечения, расположены по тексту в следующем порядке: для прибора «**Rotor-Gene**» **3000** / для англоязычной версии программы «**Rotor-Gene**» **6000 (Q)**/ для русскоязычной версии программы «**Rotor-Gene**» **6000 (Q)**.

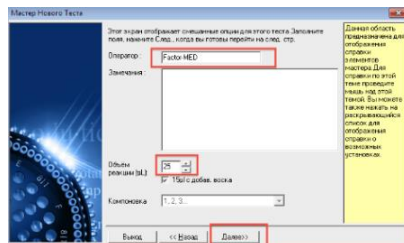
1. Открыть программу «**Rotor Gene Q**».
2. Выбрать в основном меню программы значок «**New**»/«**Новый** В открывшемся окне выбрать «**Пустой шаблон**», нажать кнопку «**New**»/«**Новый**».



3. Выбрать тип ротора. Например, «**36-Well Rotor**»/«**36-луночный ротор**» при использовании ротора на 36 образцов. Поставить отметку в окошке рядом с надписью «**No Domed 0.2 ml Tubes**»/«**Locking ring attached**»/«**Кольцо закреплено**». Нажать кнопку «**Next**»/«**Далее**».



4. Указать оператора, объем реакционной смеси «**Reaction volume**»/Объем реакции» – **25 мкл**. Для Rotor-Gene 6000 должно быть отмечено окошко «**15 µl oil layer volume**»/«**15 µL объем масла/воска**». Нажать кнопку «**Next**»/«**Далее**».



5. В верхней части окна нажать кнопку «**Edit profile**»/«**Редактор профиля**». В появившемся окне в соответствии с инструкцией к прибору задать программу амплификации с параметрами, указанными в таблице 4. Нажать клавишу «**OK**».

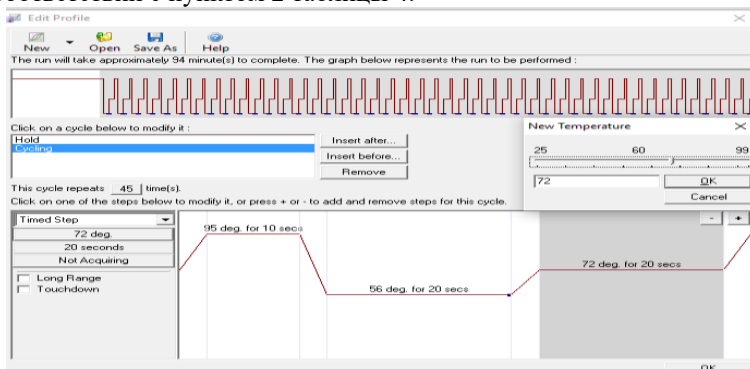
Таблица 4. Температурно-временной режим амплификации на Rotor-Gene

| № п/п | Температурно-временной режим                         | Число циклов |
|-------|------------------------------------------------------|--------------|
| 1     | 95°C – 5 мин                                         | 1            |
| 2     | 95°C – 15 сек                                        | 45           |
|       | 58°C – 60 сек, детекция <b>ROX/Orange, FAM/Green</b> |              |

Для этого требуется проделать следующие шаги:

-Нажать клавишу «**Insert after**»/«**Вставить после**» и выбрать «**New hold at temperature**»/«**Новое удержание температуры**», установить температуру 95°C и время 5 мин в соответствии с пунктом 1 таблицы 4;

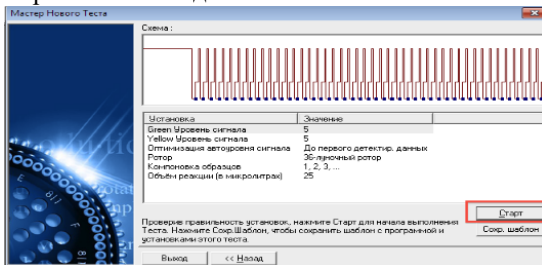
-Нажать клавишу «**Insert after**»/«**Вставить после**» и выбрать «**New cycling**»/«**Новое циклирование**», установить параметры циклирования в соответствии с пунктом 2 таблицы 4.



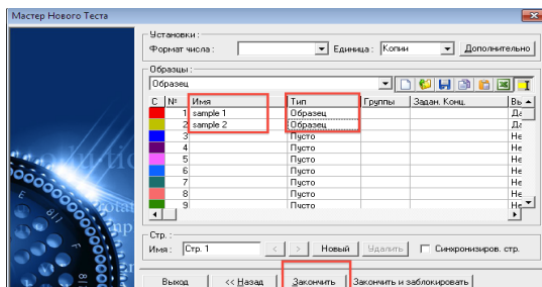
6. В нижней части окна мастера тестов нажать кнопку «**Calibrate/Gain Optimisation...**»/«**Опт.уровня сигн.**». В открывшемся окне нажать кнопку «**Опт.детек-мых**». Для обоих каналов указать нужный диапазон стартового сигнала: **Min Reading** /минимальный сигнал - 5, **Max Reading** /максимальный сигнал — 10. В графе «**Позиция Пробирки**» указать номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр «**усиления**

**сигнала»,** по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Пометить галочкой строку Perform Calibration Before 1st Acquisition **«Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции».** Закрыть окно «Авто-оптимизация уровня сигнала». Нажать кнопку **«Next»/«Далее».**

7. Запустить амплификацию кнопкой **«Start run»/«Старт».** Дать название эксперимента и сохранить его на диске.



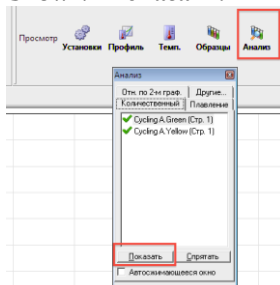
8. После запуска программы необходимо запрограммировать положение пробирок в роторе. Все пробы и контроли обозначить в меню Тип как **Unkown «Образец».**



1. После завершения термоциклирования сохранить файл с результатами исследования.

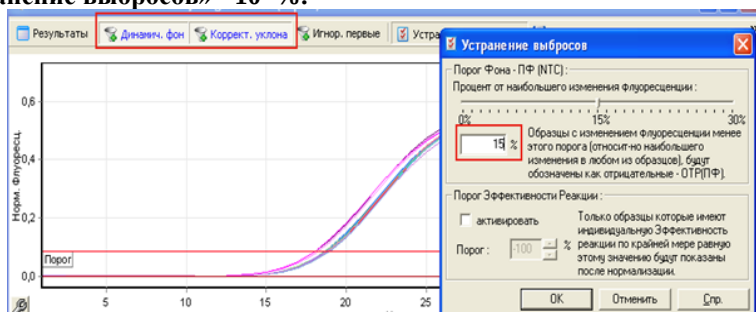
## Анализ результатов амплификации для канала FAM/ Green (BKO).

10. Нажать в меню кнопку **«Analysis»/«Анализ»,** выбрать режим анализа **«Quantitation»/«Количественный»,** нажать кнопку **«Cycling A. FAM»/«Cycling A. Green»,** далее **«Show»/«Показать».**



11. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала** в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Логарифмическая шкала**).

12. В меню основного окна нажать кнопки «**Dynamic tube**»/«**Динамич.фон**» и **Slope Correct**«**Коррект. уклона**». Установить **More settings/Outlier Removal** «**Устранение выбросов**» - **10<sup>1</sup> %**.



13. В меню «**CT Calculation**»/«**Вычисление CT**» выставить **Threshold/Порог = 0,05**. В таблице результатов (окно «**Quant. Results**»/«**Количественные Результаты**») появятся значения **Ct**.

Количественный Анализ - Cycling A. Green (Page 1)

Результаты | Динамич. фон | Коррект. уклона | Игнор. первые | ☒ Устранение вы

| № | Имя      | Тип     | CT    | Конц. Стандарта | Конц. Расч. (>) |
|---|----------|---------|-------|-----------------|-----------------|
| 1 | k+       | Образец | 17,07 |                 |                 |
| 2 | k-       | Образец |       |                 |                 |
| 3 | sample 1 | Образец | 19,88 |                 |                 |
| 4 | sample 2 | Образец | 19,33 |                 |                 |
| 5 | kv       | Образец | 18,98 |                 |                 |

**Анализ результатов амплификации для канала ROX/Orange (Listeria monocytogenes).**

14. Нажать в меню кнопку **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. ROX/Cycling A. Orange**, далее нажать **Show/Показать**

15. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала** в нижней части окна справа (если эта

<sup>1</sup> Если для отрицательного контроля этапа ПЦР К- на канале FAM/ Green при учете результатов по п 8 Инструкции наблюдается некоторое нарастание флуоресценции с пересечением пороговой линии, измените «**Устранение выбросов**» до **20%** и оцените прохождение контрольных образцов повторно.

шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Логарифмическая шкала**).

16. В меню основного окна должны быть нажаты кнопки «**Dynamic tube**»/«**Динамич.фон**» и **Slope Correct**«**Коррект. уклона**». Установить **More settings/Outlier Removal** «**Устранение выбросов**» -  $10^2$  %.

17. В меню «**СТ Calculation**»/«**Вычисление СТ**» выставить **Threshold/Порог** =0,05. В таблице результатов (окно «**Quant. Results**»/«**Количественные Результаты**») появятся значения  $C_t$ .

Учет результатов ПЦР-анализа по обоим каналам проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла « $C_t$ » для исследуемого образца).

---

<sup>2</sup> Если для отрицательных контролей этапов экстракции или ПЦР (**ВК-**, **К-**) на канале **ROX/Orange** при учете результатов по п 8 Инструкции наблюдается некоторое нарастание флуоресценции с пересечением пороговой линии, измените «**Устранение выбросов**» до **20%** и оцените прохождение контрольных образцов повторно.

## Приложение 2. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия)

В случае первого использования ПЦР-набора на приборе необходимо создать протокол с названием «ПЦР-ЛИСТЕРИОЗ-ФАКТОР» (при дальнейшей работе используют созданный шаблон).

1. Открыть программу «**RealTime PCR**» для прибора ДТ-96.
2. В появившемся окне выбрать «**Работа с прибором**».
3. В верхней части окна открыть вкладку «**Тест**» и «**Создать/Редактировать тест**»:
4. Нажать на кнопку «**Создать новый тест**» и ввести имя нового теста «**ПЦР-ЛИСТЕРИОЗ-ФАКТОР**»:  
Нажать «**ОК**».
5. В появившемся окне задать следующие параметры:

Тип – качественный

Метод – Пороговый (Ct)

Пробирки – образцы

Объем рабочей смеси в пробирке – 25 мкл

Флуорофоры – Fam; Rox

Создать программу амплификации «ПЦР-ЛИСТЕРИОЗ-ФАКТОР» нажав на иконку .

6. В редакторе программ амплификации выбрать шаблон  и нажать кнопку «**Применить**».
7. В появившемся окне в соответствии с инструкцией к прибору задать программу амплификации с параметрами, указанными в таблице 5.

Таблица 5. Температурно-временной режим амплификации на «ДТ96».

| № п/п | Температурно-временной режим            | Число циклов |
|-------|-----------------------------------------|--------------|
| 1     | 95°C – 5 мин                            | 1            |
| 2     | 95°C – 15 сек                           | 45           |
|       | 58°C – 60 сек, детекция <b>ROX, FAM</b> |              |

Детекцию осуществлять после стадии отжиг. Нажать «**ОК**» и сохранить программу под именем «ПЦР-ЛИСТЕРИОЗ-ФАКТОР ». При дальнейшей работе использовать созданную программу.

8. При запуске прибора выбрать «**Работа с прибором**» и «**Добавить тест**». В окне добавления теста выбрать «ПЦР-ЛИСТЕРИОЗ-ФАКТОР ».
9. В разделе «**1. Образцы**» ввести количество образцов включая все контрольные образцы. В разделе «**3. Контроли**» поставить нули и нажать «**ОК**».

10. Пользуясь инструкцией к прибору заполнить «**Идентификатор пробирки**» и «**Тип**», обращая внимание на порядок заполнения. Нажать кнопку «**Применить**».

11. Установить пробирки в реакционный блок согласно порядку заполнения и нажать кнопку «**Запуск программы**». В появившемся окне набрать название протокола и «**Сохранить**».

12. После завершения реакции можно сразу приступить к анализу результатов, либо при следующей загрузке нажать «**Просмотр архива**».

### Анализ результатов амплификации

13. Далее нажать на иконку с изображением папки  и выбрать файл, в котором был сохранен протокол. Выбрать тип анализа «**Ct(Cp)** для **всех каналов**». Метод – «**Пороговый (Ct)**». В окне справа отобразятся названия образцов и значения пороговых циклов. Выбрать 10%. В позиции **Критерии достоверности данных** ввести: Нижняя граница/порог положительного результата - 5%, верхняя граница/порог нормализации данных -30%.

14. Нажать кнопку «**Применить**».

15. Для получения сводного отчета по протоколу необходимо нажать кнопку   
16. В верхней части окна нажать клавишу «**Печать**» или «**Сохранить**», выбрать расширение файла, например \*.rtf MS Word, далее «**Рабочий стол**» → «**ПЦР-ЛИСТЕРИОЗ-ФАКТОР**» → «**Отчеты**» → «**Год**» → «**Месяц**», в поле «**Имя файла**» ввести название в форме «**год. месяц. число-данные**». Нажать сохранить.

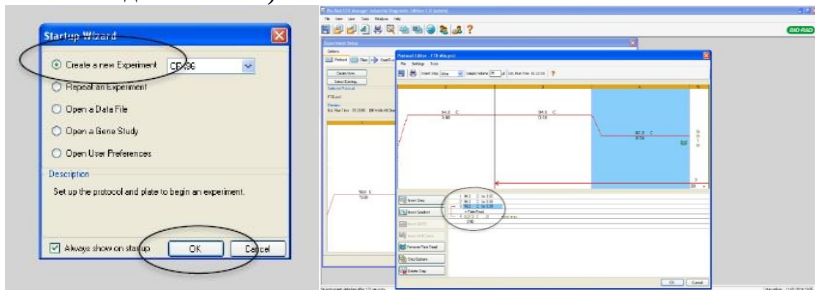
17. Нажать клавишу «**Заккрыть**».

18. Закрыть или свернуть программу «**RealTime PCR**».

Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца).

### Приложение 3. Порядок работы на приборе CFX96 (Bio-Rad, США)

1. Включить прибор и запустить программу **Bio-Rad CFX Manager**.
2. В стартовом окне необходимо выбрать **Create a new Run** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run...**).



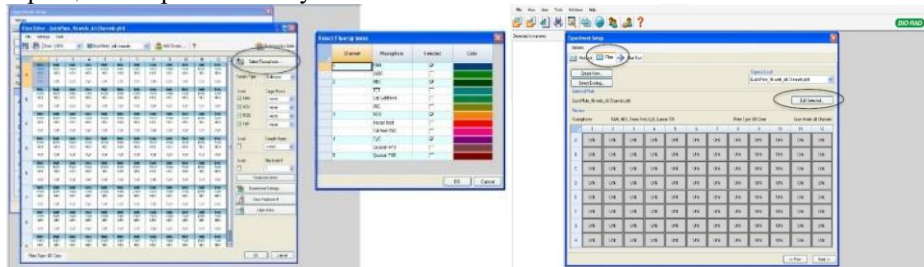
3. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации в соответствии параметрами, указанными в таблице 6.

Таблица 6. Температурно-временной режим амплификации на CFX96

| № п/п | Температурно-временной режим            | Число циклов |
|-------|-----------------------------------------|--------------|
| 1     | 95°C – 5 мин                            | 1            |
| 2     | 95°C – 20 сек                           | 45           |
|       | 58°C – 60 сек, детекция <b>ROX, FAM</b> |              |

Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл.**

4. Задать схему планшета – расположение пробирок и детекцию флуоресцентного сигнала во всех пробирках по используемым каналам в окне **Plate** модуля **Experiment Setup**. В меню **Sample type** выбрать **Unknown**, нажав на кнопку **Select Fluorophores....**, выбрать галочками флуорофоры **FAM** и **ROX** и нажать **OK**, затем задать галочками измерение флуоресцентного сигнала в выбранных пробирках по данным каналам. В окне **Sample name** задать название образцов. Сохранить схему планшета.



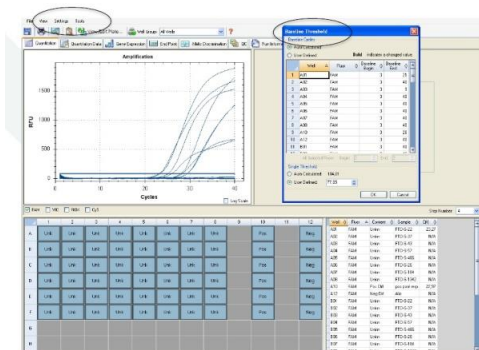
Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поставить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

5. Запустить выполнение выбранной программы «ПЦР-ЛИСТЕРИОЗ-ФАКТОР» с заданной схемой планшета, нажав кнопку **Start Run**.

6. После окончания выполнения программы можно приступить к анализу результатов с помощью программного обеспечения прибора **CFX96**.

### Анализ результатов амплификации для канала FAM (ВКО).

7. Выбрать в окне модуля **Data Analysis** во вкладке **Quantitation** данные по каналу **FAM**, выделив галочкой соответствующий бокс под графиком флуоресценции.



Установить пороговую линию на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца «К+» в последнем цикле амплификации (уровень флуоресценции считают равным ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой). Для этого пороговую линию можно либо перетащить с помощью левой кнопки мыши, либо выбрать в меню **Baseline Threshold** (по щелчку правой кнопки мыши в окне графика флуоресценции) опцию **User Defined** и ввести нужное значение в текстовом поле.

Важно, чтобы график флуоресценции для образца «К+» показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

9. В таблице результатов (окно «**Quantification Data**») появятся значения Ct.

### Анализ результатов амплификации для канала ROX (Listeria monocytogenes).

10. Выбрать в окне модуля **Data Analysis** во вкладке **Quantitation** данные по каналу **ROX**, выделив галочкой соответствующий бокс под графиком флуоресценции. Установить пороговую линию на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца «К+» в

последнем цикле амплификации (уровень флуоресценции считают равным ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой). Для этого пороговую линию можно либо перетащить с помощью левой кнопки мыши, либо выбрать в меню **Baseline Threshold** (по щелчку правой кнопки мыши в окне графика флуоресценции) опцию **User Defined** и ввести нужное значение в текстовом поле.

Важно, чтобы график флуоресценции для образца «K+» показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

11. В таблице результатов (окно «**Quantification Data**») появятся значения Ct.

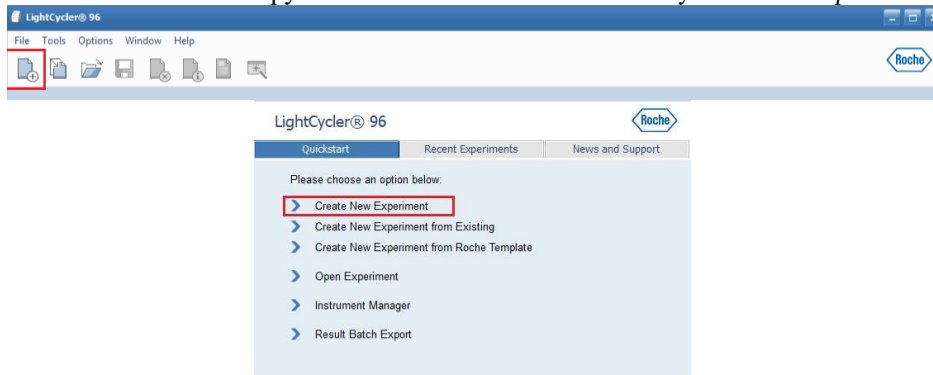
12. Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца.

## Приложение 4. Порядок работы на приборе LightCycler® 96

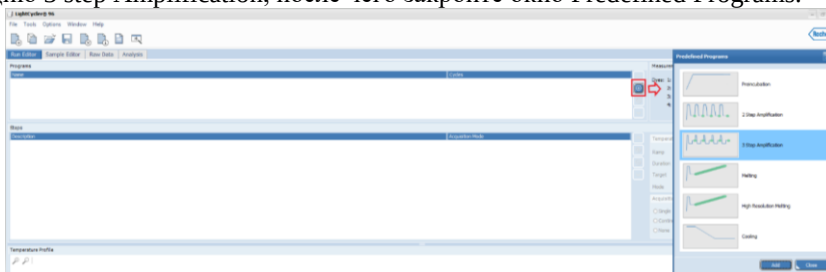
Перед началом работы включите прибор *LightCycler® 96* с помощью переключателя на задней панели прибора. Далее прибор проведет автоматическое тестирование (см. инструкцию к прибору), следует дождаться его окончания.

1. Откройте рабочую программу *LightCycler® 96*, для чего дважды кликните по значку запуска программы. Дождитесь загрузки меню и открытия основного окна после инициализации.

2. Выберите пункт *Create new Experiment (создать новый эксперимент)* либо в панели меню инструментов кликните по значку *New Experiment*.



3. В открывшемся окне выберите вкладку *Run Editor*, в боковой части окна *Programs* нажмите , после чего откроется окно *Predefined Programs*. В данном окне выберите *Preincubation*, нажмите кнопку *Add*, после чего в левой части экрана *Programs* появится стадия *Preincubation*. Аналогичным образом добавьте стадию *3 step Amplification*, после чего закройте окно *Predefined Programs*.

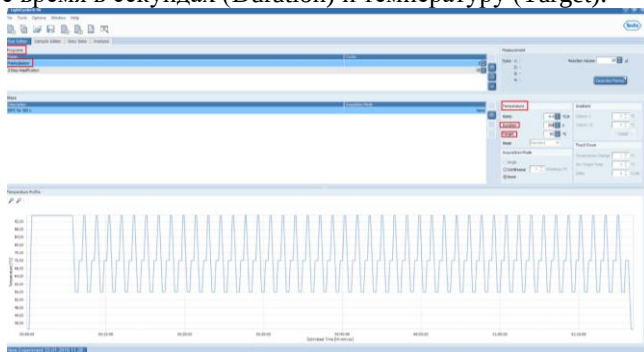


Задайте параметры амплификации в соответствии с параметрами, указанными в таблице 7.

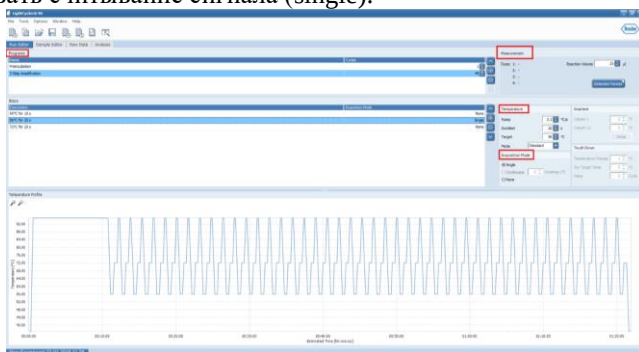
Таблица 7. Температурно-временной режим амплификации на LightCycler® 96

| № п/п | Температурно-временной режим                  | Число циклов |
|-------|-----------------------------------------------|--------------|
| 1     | 95°C – 300 сек                                | 1            |
| 2     | 95°C – 15 сек                                 | 45           |
|       | 58°C – 60 сек, детекция <b>Texas Red, FAM</b> |              |

Для этого в левой верхней части окна в разделе Programs выберите Preincubation, далее в нижней правой части, в разделе Temperature задайте необходимое время в секундах (Duration) и температуру (Target).



Далее в левой верхней части окна в разделе Programs выберите 3 step Amplification и для каждого шага детекции аналогичным образом задайте необходимые время и температуру. Шаги детекции переключаются в левой нижней части окна в разделе Steps. В разделе Acquisition Mode на нужной стадии необходимо указать считывание сигнала (single).



В столбце Cycles с помощью стрелок вверх и вниз задайте необходимое число циклов для каждого этапа.

В окне Reaction Volume, в разделе Measurement (в правой части окна) укажите объем реакции равный 25 мкл.

Под Reaction Volume нажмите вкладку

Detection Format

и отметьте флуорофоры

Fam и Texas Red

Detection Format

Channel 1, 470/514

| Selected                            | Type      | Quant Factor | Wavelength |
|-------------------------------------|-----------|--------------|------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | FAM       | 1.00         | 470.00     |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Texas Red | 1.30         | 640.00     |

Channel 2, 530/572

| Selected                            | Type      | Quant Factor | Wavelength |
|-------------------------------------|-----------|--------------|------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | FAM       | 1.00         | 530.00     |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Texas Red | 1.30         | 640.00     |

Channel 3, 570/620

| Selected                            | Type      | Quant Factor | Wavelength |
|-------------------------------------|-----------|--------------|------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | FAM       | 1.00         | 570.00     |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Texas Red | 1.30         | 640.00     |

Channel 4, 640/687

| Selected                            | Type      | Quant Factor | Wavelength |
|-------------------------------------|-----------|--------------|------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | FAM       | 1.00         | 640.00     |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Texas Red | 1.30         | 687.00     |

Integration Time

☒ Dynamic ☐ Manual

OK Cancel

4. Перейдите на вкладку Sample Editor<sup>6</sup> (правка образцов). Пустые лунки следует удалить, оставив только значимые данные, для чего выделите пустые ячейки с помощью левой кнопки мыши и нажмите кнопку в правой нижней части раздела Clear wells:

Sample Editor

File Tools Options Window Help

Run Editor Sample Editor Gene Data Analysis

Table View Table View

Table Details Gene Data Plot

Plate ID: 1 (12x12)

Reaction Properties

Sample Name: 1 (12x12)

Type: 1 (12x12)

Volume: 1 (12x12)

Concentration: 1 (12x12)

Clear wells

Gene Data Plot

Legend: Confocal, Standard, Positive control, Negative control, Non-reverse transcription control

В окне Gene задайте наименования мишеней: FAM – vko, Texas Red – Listeria.

<sup>6</sup> Образцы можно редактировать до или после поставки эксперимента: программа будет снимать данные флуоресценции по всем выбранным каналам детекции со всех 96 лунок по умолчанию.

В правой части, в разделе Reaction properties отредактируйте образцы: задайте названия и установите тип исследуемых образцов (Type Positive control для положительных образцов, Type Negative control для отрицательных контрольных образцов, Type Unknown для исследуемых образцов и ВК- (ОКО)).

5. В панели инструментов кликните по значку *Save Experiment*, чтобы сохранить новый эксперимент.

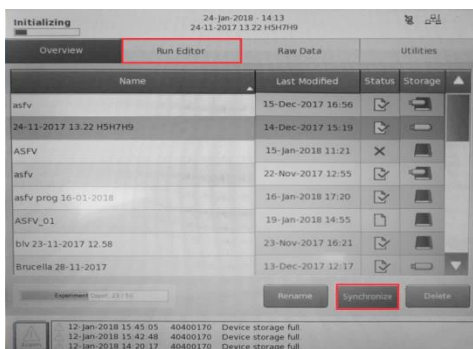


После открытия диалогового окна *Save As* выберите директорию, в которой хотите сохранить файл эксперимента. Введите имя файла эксперимента (латиницей) и нажмите *Save*. Диалоговое окно закроется, эксперимент сохранится в виде файла LightCyler® 96 (.lc96)

6. Эксперимент необходимо перенести в прибор: если прибор подключен через сетевой кабель (либо через WiFi) к компьютеру, то можно загрузить эксперимент через открытую рабочую программу LightCyler96, либо, если прибор автономен, можно воспользоваться USB носителем.

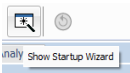
#### 6.1 Перенос эксперимента в прибор с помощью USB носителя

Вставьте USB носитель с сохраненным на нем файлом эксперимента (.lc96) в порт USB, расположенный на правой панели прибора. Как только значок USB  появится на панели состояния программы прибора LightCyler® 96, файл эксперимента будет добавлен в таблицу экспериментов во вкладке *Overview*.



Файлы, сохраненные на USB носителе, обозначены значком . Файлы, сохраненные на приборе, обозначены значком , файлы, которые хранятся и на приборе и на USB носителе, обозначены двойным значком. Для того чтобы перенести файл на прибор (и наоборот), необходимо нажать Synchronize. Постановку эксперимента можно проводить напрямую с USB носителя, после ее успешного завершения данные будут автоматически сохранены на USB носителе.

## 6.2. Перенос эксперимента в прибор с помощью рабочей программы LightCycler® 96

После сохранения эксперимента нажмите *Show Startup Wizard* . В появившемся окне выберите *Instrument Manager*:



В поле *Instrument* должен отобразиться прибор *LightCycler*. Затем перейдите на вкладку *Send/Receive Experiment* и в окне *You PC* выберите сохраненный эксперимент и нажмите . Эксперимент будет скопирован в память прибора. Дальнейший запуск программы необходимо производить с помощью сенсорной панели на самом приборе LightCycler® 96.

## 7. Запуск эксперимента

Эксперимент запускается с помощью сенсорного управления на передней части прибора.

Загрузите плашку либо пробирки с образцами в прибор LightCycler® 96. Нажмите *Start* на боковой панели общих команд основного окна программы прибора LightCycler®.

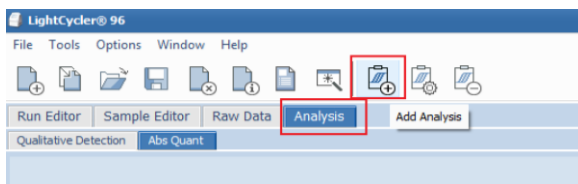


Выберите вкладку *Raw Data*, чтобы наблюдать процесс выполнения постановки.

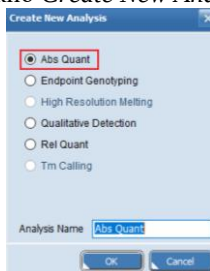
8. После завершения постановки необходимо перенести первичные данные, полученные программой прибора для проведения анализа в рабочую программу с помощью USB носителя либо с помощью сетевого подключения к прибору.

## 9. Анализ и интерпретация результатов

Откройте файл завершенного анализируемого эксперимента (со значком ) в рабочей программе LightCycler® 96. Откройте вкладку *Analysis*. На панели инструментов кликните по значку *Add Analysis*, чтобы добавить новый анализ.



Откроется диалоговое окно *Create New Analysis*. Выберите *Abs Quant*

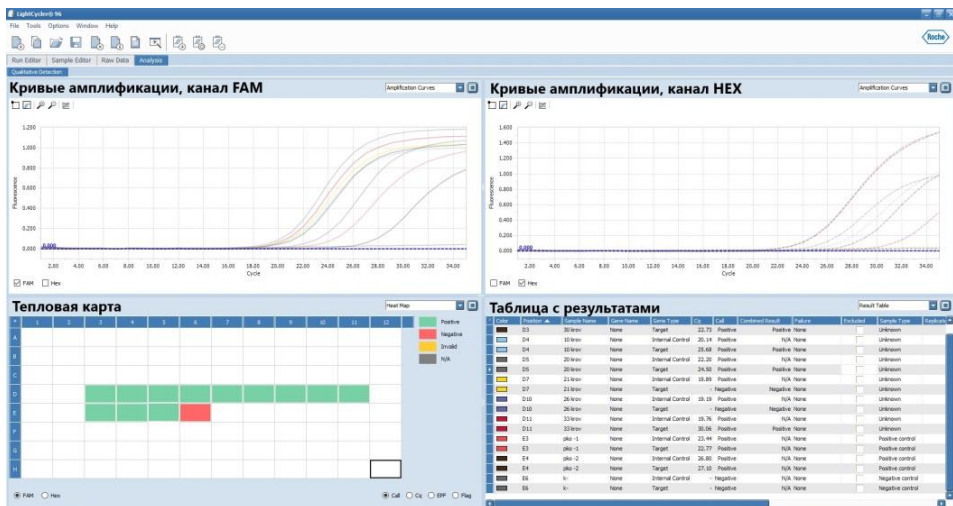


Нажмите *OK*. Во вкладке *Analysis* в соответствии с исходными настройками находятся четыре окна с результатами эксперимента:

- *Кривые амплификации*
- *Стандартные кривые<sup>7</sup>*
- *Тепловая карта*
- *Таблица с результатами*

---

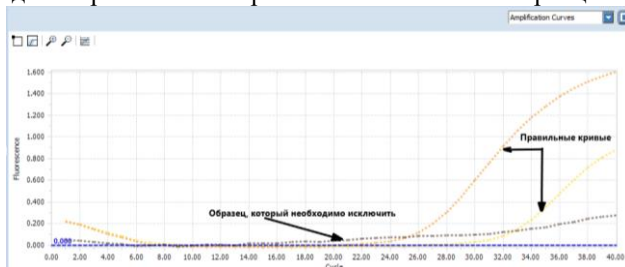
<sup>7</sup> окно Стандартные кривые не будет содержать никаких данных, поскольку в наборах не предусмотрен вариант количественного анализа



*На тепловой карте (левое нижнее окно на рисунке) зеленым цветом обозначаются положительные образцы, красным цветом обозначаются отрицательные образцы.*

**Внимание!** Необходимо визуально оценить кривые амплификации как в сыром виде (вкладка Raw Data), так и после анализа (вкладка Analysis). Кривые должны иметь классическую s-образную форму. Образцы, форма которых не соответствует классической и для которых на канале FAM (ВКО) наблюдается корректный результат необходимо исключить и считать отрицательными

Для образцов форма которых не соответствует классической и для которых на канале FAM (ВКО) наблюдается некорректный или отрицательный результат необходимо провести повторный анализ с этапа экстракции.



*Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца.*

#### Приложение 4. Лист вносимых изменений

| Редакция                 | Место вносимых изменений                                                  | Суть вносимых изменений                                                                                           |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Версия 1.1 от 22.01.2018 | Раздел «Приложения»<br>Инструкции                                         | Добавлено Приложение 4<br>«Порядок работы на приборе CFX96 (Bio-Rad, США)»                                        |
| Версия 1.2 от 12.11.2020 | Раздел «Приложения»<br>Инструкции                                         | Добавлено Приложение 5<br>«Порядок работы на приборе LightCycler® 96»                                             |
| Версия 1.3 от 25.05.2021 | стр. 5, стр. 9                                                            | Добавлены сноски, поясняющие, что вместо ОКО допускается использовать физраствор, ТЕ-буфер, дистиллированную воду |
| Версия 1.4 от 12.11.2021 | По тексту                                                                 | Добавлен материал: культуры микроорганизмов и питательные среды.<br><br>Изменения по тексту                       |
| Версия 1.5 от 10.01.2022 | По тексту                                                                 | Изменено название ВКО                                                                                             |
| Версия 1.6 от 18.02.2022 | Раздел 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб | Отредактированы рекомендации по пробоподготовке                                                                   |
| Версия 1.7 от 27.04.2022 | Раздел 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб | Добавлено: на усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала                   |

| Редакция                 | Место вносимых изменений                                               | Суть вносимых изменений                                             |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Версия 1.8 от 28.09.2022 | Приложение 2. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия) | Геометрический (Ср) метод обработки данных заменён на пороговый (Сt |
|                          |                                                                        |                                                                     |
|                          |                                                                        |                                                                     |
|                          |                                                                        |                                                                     |
|                          |                                                                        |                                                                     |
|                          |                                                                        |                                                                     |
|                          |                                                                        |                                                                     |

| <b>Редакция</b> | <b>Место вносимых изменений</b> | <b>Суть вносимых изменений</b> |
|-----------------|---------------------------------|--------------------------------|
|                 |                                 |                                |
|                 |                                 |                                |
|                 |                                 |                                |
|                 |                                 |                                |
|                 |                                 |                                |
|                 |                                 |                                |
|                 |                                 |                                |

| <b>Редакция</b> | <b>Место вносимых изменений</b> | <b>Суть вносимых изменений</b> |
|-----------------|---------------------------------|--------------------------------|
|                 |                                 |                                |
|                 |                                 |                                |
|                 |                                 |                                |
|                 |                                 |                                |
|                 |                                 |                                |
|                 |                                 |                                |
|                 |                                 |                                |

| <b>Редакция</b> | <b>Место вносимых изменений</b> | <b>Суть вносимых изменений</b> |
|-----------------|---------------------------------|--------------------------------|
|                 |                                 |                                |
|                 |                                 |                                |
|                 |                                 |                                |
|                 |                                 |                                |
|                 |                                 |                                |
|                 |                                 |                                |
|                 |                                 |                                |

По вопросам качества набора реагентов «ПЦР-ЛИСТЕРИОЗ-ФАКТОР» или по вопросам приобретения тест-систем нашего производства просьба обращаться в ООО «ВЕТ ФАКТОР» по адресу:

108840, Россия, г. Москва, г. Троицк, ул. Промышленная д.2

Тел: 8 (499) 271-71-26, добавочный 243

Email: [vet@faktor.ru](mailto:vet@faktor.ru)