

Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии
(Росстандарт)

РСТ | ВНИИМС

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы»
Регистрационный номер в реестре аккредитованных лиц № RA.RU.311787

СВИДЕТЕЛЬСТВО ОБ АТТЕСТАЦИИ МЕТОДИКИ (МЕТОДА) ИЗМЕРЕНИЙ

№ 009-055/RA.RU.311787-2022

Методика измерений массовой концентрации ДНК бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах методом ПЦР-РВ с предварительной качественной идентификацией методом петлевой изотермической амплификации
при необходимости указывают объект и метод измерений

разработанная ФГБУ «ВНИИМС»

Адрес: 1193161, г. Москва, вн.тер.г. муниципальный округ Озково-Матвеевское, ул. Озерная, д. 46

наименование организации (предприятия) разработавшей методику измерений

и регламентированная в документе «Методика измерений массовой концентрации ДНК бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах методом ПЦР-РВ с предварительной качественной идентификацией методом петлевой изотермической амплификации» 2022 г., 35 л

обозначение и наименование документа

Аттестована в соответствии с **ГОСТ Р 8.563 - 2009 «ГСИ. Методики (методы) измерений»**, аттестация осуществлена по результатам

Теоретических и экспериментальных исследований и метрологической экспертизы материалов по разработке методики

вид работ: метрологическая экспертиза материалов по разработке методик измерений,

(методов) измерений в соответствии с п. 6.4 ГОСТ Р 8.563-2009 и приказом Минпромторга № 4091 от 15.12.2015

теоретическое или экспериментальное исследование методик измерений и другие виды работ

В результате аттестации методики (метода) измерений установлено, что методика (метод) измерений соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает следующими основными метрологическими характеристиками, приведенными на оборотной стороне.

Диапазон измерений, характеристики погрешности измерений (неопределенность измерений) и (или) характеристики составляющих погрешности (при необходимости норматив: контроля)

Заместитель директора



Ф.В. Булыгин

Начальник лаборатории 009

Е.В. Кулябина

«16» декабря 2022 г.

003885

Метрологические характеристики

Т а б л и ц а 1

Характеристика	Значение
Диапазон измерений массовой концентрации ДНК <i>L. monocytogenes</i> в пробах пищевых продуктов, нг/см ³	от $1 \cdot 10^{-6}$ до $1 \cdot 10^{-2}$
Показатель повторяемости (относительное среднее квадратическое отклонение повторяемости), σ_{r0} , %	9,6
Показатель воспроизводимости (относительное среднее квадратическое отклонение воспроизводимости), σ_{R0} , %	18,4

Т а б л и ц а 2

Относительная суммарная стандартная неопределенность, $u_{c,0}$, %	Относительная расширенная неопределенность при коэффициенте охвата $k=2$, U_0 , %
18,8	37,6

Начальник лаборатории 009



Е.В. Кулябина

ОДО «КомПродСервис»

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель

ОДО «КомПродСервис»

Д. Ч. Кучинский

« 16 »

2022 г.



**МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ МАССОВОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК
БАКТЕРИЙ LISTERIA MONOCYTOGENES В ПИЩЕВЫХ
ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ПЦР-РВ С ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ
КАЧЕСТВЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИЕЙ МЕТОДОМ ПЕТЛЕВОЙ
ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ**

г. Минск

2022 г.

Сведения о разработке и аттестации методики измерений

1 РАЗРАБОТАНА:

Методика разработана Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы» (ФГБУ «ВНИИМС»)

Исполнители:

Начальник лаборатории ФГБУ «ВНИИМС», к.т.н. Кулябина Е.В.

Ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИМС», к.ф.-м.н. Кулябина Т.В.

Согласована:

Общество с дополнительной ответственностью «КомПродСервис»
(ОДО «КомПродСервис»), г. Минск, ул. Филимонова, д. 25г, пом. 1000

Руководитель:

Директор



Д.Ч. Кучинский

Исполнитель:

Зав. лабораторией



С.В. Ткачев

2 АТТЕСТОВАНА

Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы» (ФГБУ «ВНИИМС»)

Свидетельство об аттестации № 009-055/RA.RU.311787-2022

3 УТВЕРЖДЕНА

Федеральным Государственным бюджетным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы» (ФГБУ «ВНИИМС»),

4 ЗАРЕГИСТРИРОВАНА

в Федеральном информационном фонде по обеспечению единства измерений, под регистрационным номером ФР.1.31.2023.46706

МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ МАССОВОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК БАКТЕРИЙ *LISTERIA MONOCYTOGENES* В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ПЦР-РВ С ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ КАЧЕСТВЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИЕЙ МЕТОДОМ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

Дата введения: 16 декабря 2022 г.

I. НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1.1. Настоящая методика описывает процедуру установления концентрации ДНК *L. monocytogenes* в пробах пищевых продуктов методом полимеразной цепной реакции с предварительной качественной идентификацией методом петлевой изотермической амплификации ДНК бактерий *L. monocytogenes* в образцах в диапазоне от 1×10^{-6} нг/см³ до 1×10^{-2} нг/см³, что соответствует $10^3 - 10^7$ копий/ см³.

Настоящий документ учитывает требования и основные положения ГОСТ Р 8.563-2009.

1.2. Настоящая методика измерений распространяется на образцы пищевых продуктов, в том числе: мясо и мясную продукцию; рыбу и рыбную продукцию; молоко и продукты из молока; пробы овощей и изделия из них; продукты для детей и беременных.

1.3. Настоящая методика измерений предназначена для применения в органах и организациях Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, осуществляющих контроль качества и безопасности продовольственного сырья, а также может быть использована организациями, аккредитованными в установленном порядке на проведение исследований продовольственного (пищевого) сырья.

II. ТЕРМИНЫ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени;

ВКО – внутренний контрольный образец;

ОКО – отрицательный контрольный образец;

ПКО – положительный контрольный образец;

СТ – стандартный раствор;

LAMP – Loop Mediated Isothermal Amplification – петлевая изотермическая амплификация;

МУК К002-23

Методика (метод) измерений – совокупность конкретно описанных операций, выполнение которых обеспечивает получение результатов измерений с установленными показателями точности;

МИ, методика – Методика (метод) измерений;

СИ – средство измерений;

СО – стандартный образец;

НД – нормативные документы;

ISO – Международная организация по стандартизации;

Ct – Threshold Cycle – пороговый цикл.

III. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей методике использованы следующие нормативные ссылки:

ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений;

ГОСТ ISO 7218-2015 Межгосударственный стандарт. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям;

ГОСТ 31904-12 Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний;

ГОСТ Р 57989-17 Продукция пищевая специализированная. Методы выявления патогенных микроорганизмов на основе полимеразной цепной реакции

ГОСТ 32031-2012 Методы выявления бактерий *L. monocytogenes*

РМГ 61-2010 Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки

РМГ 76-2014 Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа

СП 1.3.2322-08 Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней

Примечание – При пользовании настоящей методикой измерений целесообразно проверить действие ссылочных стандартов на территории Российской Федерации по соответствующему указателю стандартов, составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящей методикой измерений следует руководствоваться замененным (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

IV. ТРЕБОВАНИЯ К ТОЧНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ

4.1 При соблюдении всех регламентированных условий и проведении анализа в точном соответствии с настоящей методикой значения метрологических характеристик результатов измерений находятся в диапазонах, приведённых в таблицах 1 и 2.

Т а б л и ц а 1

Характеристика	Значение
Диапазон измерений массовой концентрации ДНК <i>L. monocytogenes</i> в пробах пищевых продуктов, нг/см ³	от $1 \cdot 10^{-6}$ до $1 \cdot 10^{-2}$
Показатель повторяемости (относительное среднее квадратическое отклонение повторяемости), σ_{r0} , %	9,6
Показатель воспроизводимости (относительное среднее квадратическое отклонение воспроизводимости), $\sigma_{R,0}$, %	18,4

Т а б л и ц а 2

Относительная суммарная стандартная неопределенность, $u_{c,0}$, %	Относительная расширенная неопределенность при коэффициенте охвата $k = 2$, U_0 , %
18,8	37,6

Т а б л и ц а 3 – Оценка вкладов в суммарную стандартную неопределенность

Источник неопределенности	Оценка неопределенности по типу (A/B)	Значение относительной стандартной неопределенности, u_j , %
измерения в условиях прецизионности	A	97,7
неопределенность от измерения оптической плотности	B	1,2
неопределенность от измерения длины оптического пути	B	0,2
неопределенность, присущая стандартным образцам (референтным материалам)	B	0,6
неопределенность от фактора разбавления	B	0,2
неопределенность от измерения массы реагентов	B	0,1
неопределенность от чистоты реагентов	B	0,2
неопределенность, вносимая оператором	B	0,2

V. ТРЕБОВАНИЯ К СРЕДСТВАМ ИЗМЕРЕНИЙ, ИСПЫТАТЕЛЬНОМУ ОБОРУДОВАНИЮ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫМ УСТРОЙСТВАМ, КОНТРОЛЬНЫМ МАТЕРИАЛАМ И РЕАКТИВАМ

5.1 Средства измерений и посуда лабораторная

- прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q, ФИФ ОЕИ № 48068-17;
- спектрофотометр V-730 Jasco, ФИФ ОЕИ № 67389-17;
- дозаторы автоматические или механические одноканальные с переменным объемом дозирования от 5 до 50 мм³ и от 10 до 100 мм³ с допусаемым относительным СКО не более 5,0 % по ГОСТ 28311;
- прибор комбинированный Testo-608-N1, ФИФ ОЕИ № 53505-13;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным фильтром (например, Axugen, Inc., США, или аналогичные);
- пробирки DNAase-free типа «Эппендорф» объемом 1,5 см³, 0,5 см³ или 0,2 см³;
- микропробирки для ПЦР-РВ стерильные тонкостенные 0,2 см³ (плоская крышка, коническое дно) – для амплификаторов с детекцией через дно.

5.2 Испытательное оборудование, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

- настольный ПЦР-РВ-бокс с бактерицидной лампой (например, «Biosom»), либо ламинарный шкаф класса биологической безопасности II тип А (например, Kojair KR-125 Safety);
- твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» с диапазоном установки температуры от 25 до 100 °С (например, «Biosom»), либо термоциклер (например, Терцик производства «ДНК-технология», Россия), либо водяная баня с температурным диапазоном до 65 °С (любого производителя);
- микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14 тыс. об/мин.;
- вакуумный аспиратор с колбой-ловушкой;
- холодильник бытовой электрический;
- шейкер для пробирок, например, Votrex, с вставкой для одной пробирки с частотой вращения не менее 100 об/мин;
- набор для экстракции ДНК из пищевых продуктов (возможно использование различных способов для экстракции материала, в частности преципитационные методы, методы температурного, щелочного лизиса и пр.);
- набор реагентов для качественного определения ДНК *L. monocytogenes* по технологии петлевой изотермической амплификации – «Fast Fox[®] Listeria-LAMP»,

МУК К002-23

рассчитанным на проведение анализа 50 исследуемых проб пищевых продуктов, в том числе контрольных проб и калибровочных проб, состав которого представлен в таблице 4;

- набор реагентов для количественного определения ДНК *L. monocytogenes* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции, рассчитанным на проведение анализа 50 (100) исследуемых проб пищевых продуктов, в том числе контрольных проб и калибровочных проб, состав которого представлен в таблице 5;

- штативы для наконечников, микропробирок.

В ходе анализа, если не указано иное в инструкциях по применению для наборов реагентов, используют стерильную дистиллированную или деминерализованную воду, или воду эквивалентной чистоты, свободную от нуклеиновых кислот и нуклеаз, подходящие для молекулярного биологического анализа.

Т а б л и ц а 4 – Состав набора реагентов для качественного определения ДНК

L. monocytogenes методом петлевой изотермической амплификации.

	Состав	Количество	Условия хранения
1	ЛАМР-смесь-1/L.m.	1 шт, 1,3 ± 0,02 см ³	-20°C
2	Праймеры List	1 шт, 0,4 ± 0,02 см ³	-20°C
3	Праймеры ВКО	1 шт, 0,4 ± 0,02 см ³	-20°C
4	ВКО	1 шт, 0,5 ± 0,02 см ³	-20°C
5	ОКО	1 шт, 0,5 ± 0,02 см ³	-20°C
6	ПКО	1 шт, 0,25 ± 0,02 см ³	-20°C
7	Раствор для экстракции материала*	1 шт, 10 см ³ ± 0,1 см ³	+2 – 8°C

* – поставляется по согласованию с потребителем.

Т а б л и ц а 5 – Состав набора реагентов для количественного определения ДНК

L. monocytogenes методом ПЦР-РВ

	Состав	Количество	Условия хранения
1	ПЦР-РВ-смесь- <i>L. monocytogenes</i>	1 шт, 1,3 ± 0,02 см ³	-20°C
2	ПЦР-РВ-буфер	1 шт, 0,6 ± 0,02 см ³	-20°C
3	ДНК калибратор 1	1 шт, 0,4 ± 0,02 см ³	-20°C
4	ДНК калибратор 2	1 шт, 0,4 ± 0,02 см ³	-20°C
5	Отрицательный контроль	1 шт, 0,4 ± 0,02 см ³	-20°C
6	Отрицательный контроль выделения	1 шт, 2,4 ± 0,02 см ³	-20°C
7	Положительный контроль выделения	1 шт, 1,2 ± 0,02 см ³	-20°C

Примечание – Комплектация набора реагентов для количественного определения ДНК L. monocytogenes методом ПЦР-РВ может отличаться от приведенной выше.

5.3 Применяемые средства измерений

Средства измерений, перечисленные в 5.1 настоящей методики, должны быть утвержденных типов, внесены в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений и поверены. Свидетельства о поверке СИ и паспорта (сертификаты) на применяемые стандартные образцы, указанные в пункте 4.3 настоящей методики, должны быть действующими. Испытательное оборудование должно быть аттестовано в

5.4 Требования к контрольным материалам

Контрольные материалы состава *L. monocytogenes* должны быть либо тест-штаммами *L. monocytogenes*, типичными по культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам, либо референтными материалами с установленным содержанием ДНК нг/см³ (или ГЭ/мл, или колониеобразующих единиц), либо материалом, являющимся основой для сравнения последовательностей ДНК, строго специфических для генома бактерии *L. monocytogenes*, либо стандартным образцом состава бактерий *L. monocytogenes*.

*Примечание – За исключением тест-набора для качественного определения ДНК *L. monocytogenes* по технологии петлевой изотермической амплификации, указанного в пункте 5.2 настоящей методики, допускается применение других средств измерений, испытательного оборудования, вспомогательных устройств, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерений, а также реактивов и материалов, в т.ч. импортного производства, по качеству не хуже перечисленных ранее.*

VI. МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ

Методика предусматривает предварительное качественное определение *L. monocytogenes* в исследуемых образцах пищевых продуктов набором реагентов «Fast Fox[®] Listeria-LAMP». В данном случае анализ результатов проводят визуально по изменению окраски реакционной смеси после инкубирования.

Принципом метода предварительной качественной идентификации является выявление с помощью петлевой изотермической амплификации (LAMP) последовательностей (фрагментов) ДНК, строго специфических для генома бактерии *L. monocytogenes*. В основе LAMP лежит многократное увеличение числа копий (амплификация) нуклеотидных фрагментов-мишеней ДНК, ферментом Bst-ДНК-полимеразой в присутствии шести пар синтетических олигонуклеотидных праймеров и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Реакция протекает при постоянной температуре 65 °С. В процессе LAMP происходит формирование структур в форме петель, служащих шаблонами для последующей экспоненциальной амплификации аналогичных образований.

Перед проведением LAMP реакции проводится высев исследуемых образцов пищевых продуктов в соответствующие неселективные и селективные питательные среды для накопления *L. monocytogenes*.

Процесс предварительной качественной идентификации приведён в разделе XI настоящей методики.

Последующий количественный анализ проводится методом ПЦР-РВ в режиме реального времени. Порядок выполнения измерений приведён в разделе XII настоящей методики.

VII. ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ

7.1 Наборы реагентов по 5.2 должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя в холодильнике при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С (раствор для экстракции ДНК хранят при (6±2) °С) в течение всего срока годности, указанного на упаковке набора. Не допускается применение наборов реагентов или части реагентов с истёкшим сроком годности.

Допускается хранение (транспортирование) набора реагентов при температуре не выше плюс 4 °С не более 3 суток. Не допускается замораживание целого набора реагентов, следует ознакомиться и хранить наборы реагентов в соответствии с инструкцией по применению.

7.2 Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 50 исследуемых проб, ВКО, контрольных и стандартных проб.

7.3. Условия реализации настоящей методики должны соответствовать требованиям [1], [2], а также указанным в инструкциях по применению к наборам реагентов условиям.

7.4 Реализацию настоящей методики осуществляют в 2 рабочих зонах лаборатории. Зона 1 – выделение ДНК из проб биологического материала. Зона 2 – подготовка проб и контролей, внесение проб в микропробирки с реагентами, постановка LAMP и ПЦР-РВ реакции, и анализ результатов.

7.5 При утилизации пробирок после амплификации, недопустимо их открывание и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами амплификации лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

VIII. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ, ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

8.1 При выполнении измерений должны соблюдаться следующие требования безопасности:

- техника безопасности при работе с химическими реактивами и токсичными, едкими, легковоспламеняющимися веществами – по ГОСТ 12.1.007;
- организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004;
- микробиологические работы, LAMP и ПЦР-РВ-реакцию проводят с соблюдением требований ГОСТ ISO 7218, СП 1.3.2322-08, [1], [2].

8.2 Помещение, в котором производится выполнение измерений, должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией, соответствовать требованиям пожарной безопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения в соответствии с ГОСТ 12.4.009.

МУК К002-23

8.3 При выполнении измерений с использованием амплификатора и работе с электроустановками необходимо соблюдать правила электробезопасности в соответствии ГОСТ 12.1.019 и правила, описанные в соответствующих инструкциях по эксплуатации.

8.4 Пробы, не прошедшие температурную обработку во время этапа выделения ДНК (п. 11.6), представляют биологическую опасность, при работе с такими пробами следует соблюдать меры безопасности с соблюдением требований СП 1.3.2322-08.

8.5 Утилизацию проб после реализации настоящей методики проводят в соответствии с СП 1.3.2322-08, [1].

IX. ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРОВ

К подготовке проб, выполнению измерений и обработке их результатов допускаются сотрудники с высшим или средним специальным образованием, прошедшие соответствующую подготовку и имеющие навыки работы в области LAMP или ПЦР-РВ анализа. К проведению анализа допускается только персонал, ознакомленный с руководством по эксплуатации амплификатора и освоивший настоящую методику.

X. ТРЕБОВАНИЯ К УСЛОВИЯМ ИЗМЕРЕНИЙ

При выполнении измерений соблюдают следующие условия

- температура окружающего воздуха от плюс 20 °С до плюс 30 °С;
- относительная влажность воздуха не более 80 %.

XI. ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ

11.1 Отбор и правила хранения проб

Отбор проб пищевых продуктов для анализа проводят согласно методам отбора по ГОСТ 31904, ГОСТ ISO 7218, [2] а также в соответствии с требованиями нормативных документов на конкретные виды продуктов.

До проведения анализа пробы сохраняют в сухом, защищенном от света месте, в том числе пробы скоропортящихся продуктов – при температуре (4 ± 2) °С, охлажденных сырых мясных и рыбных продуктов – при температуре (2 ± 2) °С. После вскрытия упаковки пробы подвергают анализу немедленно.

11.2 Подготовка средств измерений

Средства измерений, испытательное оборудование и вспомогательные устройства подготавливают к проведению измерений в соответствии с Руководством по эксплуатации.

11.3 Подготовка наборов и реагентов

Перед проведением измерений все компоненты наборов для качественного и/или количественного определения *L. monocytogenes*: LAMP смесь-1/L.m., отрицательный

МУК К002-23

контрольный образец, праймеры List, праймеры ВКО и положительный контрольный образец, необходимо разморозить, перемешать на вортексе не менее 5 с, осадить капли с крышки пробирки и поместить на охлаждаемый штатив либо ледяную баню. Во время проведения анализа образцы и реактивы должны находиться при температуре не выше плюс 4 °С, при проведении разбавлений вода и образцы должны иметь одинаковую температуру.

11.4 Подготовка проб к анализу

Подготовку проб проводят по ГОСТ ISO 7218, ГОСТ Р 57989, [2], а также в соответствии с действующими нормативными документами на конкретные виды продуктов.

11.5 Посев проб в среды обогащения

Подготовленные по 11.4 пробы засевают в жидкие питательные среды и инкубируют для подращивания находящихся в пищевых продуктах *L. monocytogenes* и накопления их биомассы в соответствии с ГОСТ Р 57989, [2].

Материалом для дальнейшего анализа служат пробы культуральной жидкости, представляющей собой биомассу искомым микроорганизмов с совокупностью образованных ими продуктов метаболизма в питательных средах для селективного обогащения, полученную при оптимальных для данных микроорганизмов режимах инкубации.

*Примечание - При наличии эпидемиологических данных о возможности массивного заражения пищевого продукта *L. monocytogenes* в ходе расследования вспышек пищевых отравлений допускается анализировать инкриминированные пробы нативных (не подвергавшихся инкубации в жидких средах обогащения) пищевых продуктов с целью получения предварительных данных о причинном агенте вспышки. При этом положительные результаты LAMP-анализа таких проб должны подтверждаться выделением возбудителя в культуре, а отрицательные результаты не должны интерпретироваться и не могут служить основанием для прекращения анализа проб с инкубацией.*

11.6 Выделение ДНК из анализируемого материала

Экстракция ДНК из каждой анализируемой пробы проводится в присутствии ВКО, для контроля правильности (точности) этапов выделения и амплификации ДНК.

Для экстракции ДНК применяют коммерчески доступные комплекты реагентов на основе методов сорбции ДНК на силикагеле или преципитации ДНК в соответствии с инструкцией производителя.

11.6.1 Процедура выделения ДНК с использованием раствора для экстракции ДНК, входящего в набор «Fast Fox® Listeria-LAMP» проводят в соответствии с инструкциями к наборам.

11.7 Качественный анализ

С целью получения предварительных данных об уровне контаминации пищевого

МУК К002-23

продукта *L. monocytogenes* проводят качественный анализ с использованием набора реагентов «Fast Fox[®]Listeria-LAMP».

11.7.2 Процедуру выделения ДНК проводят согласно пункту 11.6 настоящей методики.

11.7.3 В пробирке вместимостью 1,5 см³ приготовить смесь для обнаружения ДНК *L. monocytogenes*. Из расчёта на N выделений внести в пробирку дозатором одноканальным с объемом дозирования от 5 до 50 мм³ (п. 5.1) 12,5·(N+1) мкл LAMP смесь-1/L.m. и 7,5·(N+1) мкл праймеров List.

11.7.4 В пробирке вместимостью 1,5 см³ приготовить смесь для обнаружения ВКО. Из расчёта на N выделений внести в пробирку дозатором одноканальным с объемом дозирования от 5 до 50 мм³ (п. 5.1) 12,5·(N+1) мкл LAMP смесь-1/L.m. и 7,5·(N+1) мкл праймеров ВКО.

11.7.5 перемешать содержимое пробирок на вортексе, раскатать дозатором одноканальным с объемом дозирования от 10 до 100 мм³ (п. 5.1) по 20 мкл в предварительно подготовленные и подписанные пробирки для проведения LAMP.

11.7.6 В соответствующие предварительно подготовленные и подписанные отдельные пробирки добавить по 5 мкл ДНК исследуемых образцов, ПКО и ОКО. Добавление ДНК исследуемых образцов дублируется и вносится в пробирки с праймерами List и праймерами ВКО.

11.7.7 Герметично закрыть пробирки крышками до характерного щелчка. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить их кратковременным центрифугированием. Общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл, включая объем пробы ДНК.

11.7.8 Установить температуру водяной бани 65 °С, либо запрограммировать термоциклер и осуществить инкубирование в соответствии с режимом, указанным в таблице 6.

Т а б л и ц а 6 – Режим инкубирования при проведении качественного анализа с использованием набора реагентов «Fast Fox[®]Listeria-LAMP»

Цикл	Температура, °С	Время, мин	Количество циклов
1	65	60	1

11.7.9 Контроль результатов анализа следует проводить визуально, оценивая цвет реакционной смеси после завершения инкубирования. Изменение начального цвета реакционной смеси с насыщенного желтого на насыщенный пурпурный говорит о присутствии в исследуемом образце искомой ДНК *L. monocytogenes* (пробирка с праймерами List) или об отсутствии ингибирования LAMP-реакции (пробирка с

МУК К002-23

праймерами ВКО). Сохранение насыщенного желтого цвета реакционной смеси свидетельствует об отсутствии ДНК *L. monocytogenes* в исследуемом образце (пробирка с праймерами List) или о наличии ингибирования реакции (пробирка с праймерами ВКО). Дальнейший количественный анализ результатов может проводиться только в случае одновременного пурпурного окрашивания в пробирке с пробой и в пробирке с праймерами ВКО.

11.7.10 Результат предварительного качественного анализа оформляется в виде протокола. Форма протокола устанавливается лабораторией.

11.7.11 Решение о необходимости проведения дальнейшего количественного анализа принимает ответственный сотрудник в соответствии с внутренним регламентом, описывающим порядок технологических процессов, определённым в НД, входящих в систему менеджмента качества лаборатории, в которой применяется данная методика.

ХII. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

- 1 Выбрать набор реагентов для проведения количественной ПЦР-РВ.
- 2 Выбрать контрольный материал согласно п. 5.4. Экстрагировать ДНК из контрольного материала согласно п. 11.6.
- 3 Измерить в экстракте массовую концентрацию ДНК *L. monocytogenes* (нг/см³), согласно приложению В.
- 4 Приготовить 3 стандартных разведения (стандартные растворы) ДНК *L. monocytogenes* с шагом 1:10 в ПЦР-РВ-буфере в диапазоне концентраций методики.
- 5 Подготовить реакционную смесь для ПЦР-РВ в соответствии с инструкцией производителя набора реагентов.
- 6 Подготовить амплификатор в соответствии с руководством по эксплуатации.
- 7 Установить подготовленные ПЦР-РВ-матрицы (пробирки, планшеты) в амплификатор нуклеиновых кислот в соответствии с инструкцией по эксплуатации. С использованием управляющего программного обеспечения для амплификатора ввести программу амплификации. Для каждого набора реагентов установить соответствующий канал регистрации флуоресцентного сигнала.
- 8 Выбрать отображение результатов в единицах массовой концентрации (нг/см³).
- 9 Запустить анализ.

ХIII. ОБРАБОТКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

8.1 Регистрация результатов амплификации происходит автоматически в режиме реального времени и отображается в виде графиков зависимости флуоресцентного сигнала от номера цикла ПЦР-РВ. Расчет значений пороговых циклов (*Ct*) производится в соответствии с руководством к программному обеспечению амплификатора. Определение концентрации ДНК *L. monocytogenes* производится в соответствии с заданными значениями концентраций стандартных растворов и полученными значениями *Ct* для стандартных растворов и исследуемых проб.

$$Ct = a \times \log_{10} Q_{\text{ДНК}} + b, \quad (1)$$

$$Q_{\text{ДНК}} = 10^{\left(\frac{Ct - b}{a}\right)}, \quad (2)$$

где a, b – коэффициенты линейной регрессии, рассчитываемые методом наименьших квадратов на основании пар значений $\log_{10} Q_{\text{ДНК}}$ и Ct , полученных для градуировочных растворов;

МУК К002-23

$Q_{\text{ДНК}}$ – результат измерений массовой концентрации ДНК *L. monocytogenes*, нг/см³;

Ct – значение порогового цикла.

8.2 Заключение о присутствии *L. monocytogenes* в исследованной пробе выдают при получении положительного результата ПЦР-РВ (выявлении ДНК *L. monocytogenes* в пробе).

8.3 Заключение об отсутствии *L. monocytogenes* в исследованной пробе выдают при получении отрицательного результата LAMP реакции и/или ПЦР-РВ (невыявлении ДНК *L. monocytogenes*) при исследовании образцов пищевых продуктов, подвергнутых инкубации в питательных средах.

8.4. Заключение об отсутствии *L. monocytogenes* в исследованном нативном продукте, исследуемом при расследовании вспышек, при получении отрицательного результата ПЦР-РВ (невыявлении ДНК искомым микроорганизмов), не выдётся.

8.5 При применении наборов реагентов (тест-систем) для определения ДНК *L. monocytogenes* методом ПЦР-РВ интерпретацию результатов проводят в соответствии с инструкцией по применению соответствующего набора.

XIV. ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

14.1 Результат измерений массовой концентрации ДНК *L. monocytogenes* (C , нг/см³) в пробах пищевых продуктов представляют в виде (6)

$$C \pm U \text{ (при } k = 2\text{), нг/см}^3 \quad C \pm \Delta \text{ (при } P = 0,95\text{), нг/см}^3, \quad (6)$$

где U – значение абсолютной расширенной неопределенности результата измерений массовой концентрации *L. monocytogenes* при $k = 2$, нг/см³, рассчитываемое по формуле (7) г/см³,

$$U = \frac{U_0 \cdot C}{100}, \quad (7)$$

U_0 – значение относительной расширенной неопределенности по таблице 2, %;

Δ – значение абсолютной погрешности результата измерений массовой концентрации ДНК *L. monocytogenes* при $P = 0,95$, нг/см³, рассчитываемое по формуле (8)

$$\Delta = \frac{\delta \cdot C}{100}, \quad (8)$$

где C – результат измерений массовой концентрации ДНК *L. monocytogenes*, нг/см³,

δ – значение показателя точности (относительной погрешности), %.

Полный бюджет неопределенности приведен в Приложении Г.

14.2 Значение абсолютной погрешности (неопределенности) измерений округляют до двух значащих цифр. Числовое значение результата измерений должно оканчиваться цифрой того же разряда, что и значение погрешности.

14.3 В случае, если окончательный результат измерений находится выше или ниже

МУК К002-23

границ диапазона измерений, то расчет концентрации *L. monocytogenes* не проводят, результат оформляют в виде $C \leq C_{LOQ}$, где C_{LOQ} – нижняя граница диапазона измерений, нг/см³, либо $C \geq C_{HOQ}$, где C_{HOQ} – верхняя граница диапазона измерений, нг/см³.

XV. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

15.1 Контроль прецизионности результатов измерений концентрации ДНК *L. monocytogenes* осуществляют в условиях внутрилабораторной прецизионности на основании результатов измерений концентрации ДНК *L. monocytogenes* при реализации методики измерений в лаборатории путем оценки показателя внутрилабораторной прецизионности. Показатель внутрилабораторной прецизионности может быть оценен с применением либо тест-штамма *L. monocytogenes*, типичным по культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам, либо референс материала с установленным содержанием колониобразующих единиц с оформлением протокола установления показателей прецизионности результатов измерений с учетом положений, установленных в Приложении А РМГ 76 и не должен превышать значений показателя прецизионности в условиях воспроизводимости согласно таблице 1 настоящей методики измерений.

Оперативный контроль показателя прецизионности осуществляется внутри лаборатории с периодичностью, установленной в конкретной лаборатории собственными внутренними НД.

15.2 Контроль погрешности результатов измерений массовой концентрации ДНК *L. monocytogenes* с применением образцов для контроля.

Контроль погрешности результатов измерений концентрации ДНК *L. monocytogenes* проводят в соответствии с пунктом 5.5 РМГ 76 с применением образцов для контроля (далее – ОК) по инструкции, приведённой в Приложении Б настоящей методики измерений.

При реализации контрольной процедуры получают результат контрольного измерения концентрации ДНК *L. monocytogenes* в ОК С и сравнивают его с аттестованным значением А.

Результат контрольной процедуры (K_k , нг/см³) рассчитывают по формуле (9)

$$K_k = \bar{X} - A. \quad (9)$$

Норматив контроля (K , нг/см³) рассчитывают по формуле (10)

$$K = \Delta, \quad (10)$$

где Δ – значение абсолютной погрешности результата измерений концентрации *L. monocytogenes* при $P = 0,95$, нг/см³.

Сопоставляют результат контрольной процедуры с нормативом контроля. Если результат контрольной процедуры удовлетворяет требованиям (11)

$$|K_k| \leq K, \quad (11)$$

то процедуру анализа признают удовлетворительной.

МУК К002-23

В случае невыполнения условия (11) контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении этого условия должны быть установлены причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и приняты меры по их устранению.

15.3 Результаты измерений, полученные при контроле погрешности результатов измерений, могут быть использованы при реализации контроля стабильности результатов измерений концентрации ДНК *L. monocytogenes*. Процедуры контроля стабильности результатов измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории.

БИБЛИОГРАФИЯ

- [1] МУ 1.3.2569-09 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности
- [2] МУК 4.2.2872-11 Методы выявления и идентификации патогенных бактерий - возбудителей инфекционных заболеваний с пищевым путем передачи в продуктах питания на основе ПЦР-РВ с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.
Методические указания

ПРИЛОЖЕНИЕ А**(обязательное)****Область применения методики измерений**

Таблица А.1 – Область применения

Код ОКПД2	Объект измерений
01.13.1	Культуры овощные салатные или зеленые
01.13.4	Корнеплоды и клубнеплоды овощные, культуры овощные луковичные
10.12.10.110	Мясо птицы охлажденное, в том числе для детского питания
10.20.15	Мясо рыбы (включая фарш) мороженное
10.20.1	Продукция из рыбы свежая, охлажденная или мороженая
10.51	Молоко и молочная продукция
10.86.10.123	Каши молочные, готовые к употреблению, для детей раннего возраста
10.86.10.136	Каши молочные сухие (восстанавливаемые до готовности в домашних условиях путем разведения питьевой водой) для детей раннего возраста
10.86.10.650	Изделия кулинарные мясные, мясосодержащие и из мяса и субпродуктов птицы для детского питания
10.86.10.651	Изделия кулинарные мясные для детского питания
10.86.10.652	Изделия кулинарные мясосодержащие для детского питания
10.86.10.653	Изделия кулинарные из мяса и субпродуктов птицы для детского питания
10.86.10.682	Консервы мясо-растительные с использованием мяса птицы для детского питания
10.86.10.683	Консервы растительно-мясные с использованием мяса птицы для детского питания

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(обязательное)

Алгоритм оценки показателей точности для других матриц

Б.1 План-эксперимент должен быть построен с учетом раздела 5 РМГ 61-2010 «Метод оценки показателей качества методики анализа с помощью набора образцов для оценивания».

Б.2 Образцами для оценивания служат контрольные образцы (КО), приготовленные по процедуре изложенной в Приложении В настоящей методики.

Б.3 Рекомендуется готовить КО таким образом, чтобы содержание в них анализируемой ДНК охватило весь желаемый диапазон.

Б.4 Для каждого КО выполняют по 5 серий измерений в 2 параллелях массовой концентрации ДНК *L. monocytogenes* в условиях воспроизводимости (т.е. разными операторами, в разные дни, с использованием разных тест-систем, разных наборов мерной посуды) в точном соответствии с методикой измерений. Результаты параллельных измерений X_1 и X_2 должны быть получены в условиях повторяемости (т.е. одним оператором, с применением одного набора, в близкий промежуток времени).

Таблица Б.1 – Форма представления статистических данных при оценке прецизионности и правильности

Номер КО m $= 1, \dots, M$	Аттестованное значение концентрации ДНК <i>L. monocytogenes</i> в КО, нг/см ³	Номер серии $i = 1, \dots, L$	Результаты единичного анализа концентрации ДНК <i>L. monocytogenes</i> в КО	
			C_1 , нг/см ³	C_2 , нг/см ³
1		1		
		2		
		3		
		4		
		5		
...	
M		1		
		2		
		3		
		4		
		5		

Б.5 Оценка показателя повторяемости

Рассчитывают среднее арифметическое $S_{m,l}$ и выборочную дисперсию $S_{m,l}^2$ результатов единичного анализа массовой концентрации ДНК *L. monocytogenes* в m -ом КО, полученных в условиях повторяемости (параллельных определений)

$$X_{m,l} = \frac{\sum_{i=1}^N X_{m,l,i}}{N}, \quad (\text{Б.1})$$

$$S_{m,l}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (X_{m,l,i} - X_{m,l})^2}{N-1}, \quad (\text{Б.2})$$

$$m = 1, \dots, M; \quad l = 1, \dots, L. \quad (\text{Б.3})$$

На основе полученных значений выборочных дисперсий $S_{m,1}^2, \dots, S_{m,L}^2$ в m -ом КО проверяют гипотезу о равенстве генеральных дисперсий, используя критерий Кохрена. Значение критерия Кохрена $G_{m(\max)}$ рассчитывают по формуле

$$G_{m(\max)} = \frac{(S_{m,l}^2)_{\max}}{\sum_{l=1}^L S_{m,l}^2} \quad (\text{Б.4})$$

и сравнивают его с табличным значением этого критерия $G_{\text{табл}}$, равным 0,841.

Если $G_{m(\max)} > G_{\text{табл}}$, то соответствующее $(S_{m,1}^2)_{\max}$ из дальнейших расчетов исключают.

Не исключенные из расчетов $S_{m,l}^2$ считают однородными и по ним оценивают средние квадратические отклонения (далее – СКО), характеризующие повторяемость результатов единичного анализа (параллельных определений), полученных для массовой концентрации, соответствующей массовой концентрации ДНК *L. monocytogenes* в m -ой пробе. Эти СКО - $S_{r,m}$ рассчитывают по формуле

$$S_{r,m} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^{L'} S_{m,l}^2}{L'}}, \quad (\text{Б.5})$$

где в числе слагаемых нет отброшенных значений и L' – число неотброшенных дисперсий.

Показатель повторяемости в виде СКО – $\sigma_{r,m}$ для массовой концентрации ДНК в m -ом КО, устанавливают, принимая равным $S_{r,m}$

$$\sigma_{r,m} \approx S_{r,m}. \quad (\text{Б.6})$$

Б.6 Оценка показателя воспроизводимости

Проводят проверку средних значений, полученных в условиях повторяемости, $X_{m,l}$, на наличие выбросов по критерию Граббса.

Для результатов анализа каждого КО $\{X_{m,l}, l = 1, \dots, L\}$ находят максимальное

$X_{m,max}$ и минимальное $X_{m,min}$ значения.

Рассчитывают X_m – общее среднее значение результатов анализа, полученных в условиях воспроизводимости и их средние квадратические отклонения S_m по формулам

$$X_m = \frac{\sum_{l=1}^L X_{m,l}}{L}, \quad (\text{Б.7})$$

$$S_m = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L (X_{m,l} - X_m)^2}{L-1}}. \quad (\text{Б.8})$$

Рассчитывают статистики Граббса:

$GR \frac{X_{m,max} - X_m}{S_m}$ и $GR \frac{X_m - X_{m,min}}{S_m}$ и сравнивают их с критическим значением

$GR_{табл}$, равным 1,715 (для числа серии измерений $L = 5$).

Если $GR_{табл,m,max}$ или/и $GR_{табл,m,min}$, то соответствующие результаты $X_{m,max}$ или/и $X_{m,min}$ из дальнейших расчетов исключают.

Рассчитывают СКО результатов анализа m -го КО, полученных в условиях воспроизводимости, $S_{R,m}$ по формуле

$$S_{R,m} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^{L'} (X_{m,l} - X'_m)^2}{L'-1} + \left(\frac{1}{2} - \frac{1}{N'}\right) S_{r,m}^2}, \quad (\text{Б.9})$$

где среди результатов нет отброшенных;

L' – число неотброшенных результатов;

X'_m – среднее арифметическое неотброшенных результатов;

N' – число неотброшенных результатов измерений, выполненных для m -й пробы.

Показатель воспроизводимости методики анализа в виде СКО – $\sigma_{R,m}$ для содержания, соответствующего массовой концентрации ДНК *L. monocytogenes* в m -ом КО, устанавливают, принимая равным $S_{R,m}$

$$\sigma_{R,m} \approx S_{R,m}. \quad (\text{Б.10})$$

Б.7 Оценка показателя правильности

Рассчитывают значение смещения – θ_m как разность между средним значением результатов анализа X_m и аттестованным значением A_m для m -го КО:

$$\theta_m = X_m - A_m, m = 1, \dots, M. \quad (\text{Б.11})$$

Проверяют значимость вычисленных значений θ_m по критерию Стьюдента. Для этого рассчитывают значение t -критерия для m -го КО – t_m

$$t_m = \frac{|\theta_m|}{\sqrt{\frac{S_m^2}{L} + \frac{4A_{m,m}^2}{3}}}, \quad (\text{Б.12})$$

МУК К002-23

где $S_m^2 = \frac{\sum_{l=1}^L (X_{m,l} - X_m)^2}{L-1}$ – дисперсия, характеризующая разброс средних арифметических результатов единичного анализа $X_{m,l}$ относительно среднего значения результатов анализа X_m ;

$\Delta_{A,m}$ – погрешность аттестованного значения m -го КО.

Полученное значение t_m сравнивают с $t_{\text{табл}}$ при числе степеней свободы $f=L-1$ для доверительной вероятности $P=0,95$. Для $f=4$ $t_{\text{табл}}=2,78$.

Если $t_m \leq t_{\text{табл}}$, то оценка смещения незначима на фоне случайного разброса, и в этом случае ее принимают равной нулю ($\theta_m = 0$).

Если $t_m > t_{\text{табл}}$, оценка значения смещения значима на фоне случайного разброса. В этом случае методика измерений подлежит доработке.

При незначимости смещения показатель правильности методики измерений рассчитывается по формуле

$$\Delta_{c,m} = 1,96 \sqrt{\frac{S_m^2}{L} + \frac{\Delta_{A,m}^2}{3}} = 1,96 \cdot \sigma_{c,m}. \quad (\text{Б.13})$$

Б.8 Оценка показателя точности

Показатель точности методики измерений (для содержания, соответствующего массовой концентрации ДНК *L. monocytogenes* в m -м КО) при получении экспериментальных данных в условиях воспроизводимости для принятой вероятности $P = 0,95$ рассчитывают по формуле

$$\Delta_m = 1,96 \sqrt{\sigma_{R,m}^2 + \sigma_{c,m}^2}. \quad (\text{Б.14})$$

ПРИЛОЖЕНИЕ В**(обязательное)****Процедура приготовления и расчет метрологических характеристик образцов для оценивания**

В.1 Для проведения контроля качества результатов измерений при реализации методики измерений используют образцы для оценивания (далее – ОО), аттестованные по процедуре приготовления на массовую долю анализируемой ДНК.

В.2 ОО с аттестованным значением массовой доли ДНК *L. monocytogenes* готовят из исходного раствора ДНК, полученного путем экстракции из тест-штамма *L. monocytogenes*, типичного по культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам, либо референс материала с установленным содержанием колониеобразующих единиц *L. monocytogenes*, и рабочих проб, представляющих собой чистый исследуемый материал, который изначально не содержал *L. monocytogenes*.

В.3 Алгоритм приготовления стандартных и рабочих растворов ДНК *L. monocytogenes*

Приготовление стандартных растворов ДНК *L. monocytogenes* выполняют путем разбавления точно известной аликвоты исходного раствора ДНК, экстрагированного из культуры *L. monocytogenes*. Бактериальную культуру получают путем двухэтапного селективного обогащения референс материала *L. monocytogenes* в среде Фразера в соответствии с ИСО 11290-1:2017 [1]. Пример референс материала состава *L. monocytogenes*:

- референс материал *L. monocytogenes* NCTC 11994 с массовой долей микроорганизма $1,26 \times 10^5$ и с границами расширенной неопределенности $\pm 0,5 \log_{10}$ ($k = 2$) при $P = 0,95$.

В исходном растворе (ИР) концентрацию ДНК определяют на спектрофотометре в соответствии с [2]. Пробу готовят следующим образом: 0,1 см³ раствора экстрагированной ДНК вносят в кювету спектрофотометра, далее в кювету добавляют 0,9 см³ Tris-HCl буфера, рН 7,5. Концентрацию ДНК измеряют с использованием переводного коэффициента 50 (с учетом перевода в нг/см³ – 50000) [2, 3]. Концентрацию ДНК ($C_{\text{ИР}}$, нг/см³) в исходном растворе рассчитывают по формуле:

$$C_{\text{ИР}} = F \times (D_{260} - D_{320}) \times 50000 \quad (\text{В.1})$$

где

D_{260} – оптическая плотность раствора ДНК при 260 нм;

D_{320} – оптическая плотность раствора ДНК при 320 нм;

МУК К002-23

F – коэффициент разбавления равный 10;

50000 – переводной коэффициент, нг/см³.

Выполняют 4 измерения в условиях повторяемости, далее рассчитывают среднее арифметическое \bar{X} результатов измерений

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{N} \quad (\text{B.2})$$

где

X_i – результат единичного анализа i ;

N – количество измерений.

Концентрацию ДНК в растворе, вводимом в пробу в качестве добавки ($C_{p-ра(CO)}$, нг/см³) рассчитывают по формуле

$$C_{p-ра(CO)} = \frac{C_{CO} \cdot V_{CO}}{V_{МК}}, \quad (\text{B.3})$$

где C_{CO} – значение концентрации ДНК *L. monocytogenes* в СО (исходном растворе ДНК), нг/см³);

V_{CO} – объем аликвоты СО, см³;

$V_{МК}$ – объем мерной колбы, см³.

Границы погрешности приготовления стандартных растворов ДНК *L. monocytogenes* с массовыми концентрациями ДНК в стандартном растворе, вводимом в пробу в качестве добавки, при доверительной вероятности $P=0,95$ (без учета знака), $\Delta C_{p-ра(CO)}$, нг/см³) рассчитывают по формуле

$$\Delta C_{p-ра(CO)} = C_{p-ра(CO)} \sqrt{\left(\frac{\Delta C_{CO}}{C_{CO}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_{МК}}{V_{МК}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_{алик}}{V_{алик}}\right)^2}, \quad (\text{B.4})$$

где $\Delta V_{МК}$ – характеристика погрешности мерной колбы, см³;

$\Delta V_{алик}$ – характеристика погрешности одноканального дозатора (объем дозирования от 100 до 1000 мм³), см³;

$C_{p-ра(CO)}$ – массовая концентрация конечного стандартного раствора СО, нг/см³;

ΔC_{CO} – характеристика погрешности значения СО при доверительной вероятности $P=0,95$, применяемого для приготовления стандартных растворов ДНК, нг/см³.

В.4 Приготовление проб, загрязненных ДНК *L. monocytogenes*

В приготовленные по 11 пробы вводят добавку таким образом, чтобы содержание в пробах анализируемой ДНК охватило весь диапазон методики.

В качестве КО применяют однородные по составу, стабильные рабочие пробы, заведомо не содержащие ДНК *L. monocytogenes*. Были выбраны типичные представители среди пищевых продуктов: мясо курицы, мясо рыбы, творог; капуста белокочанная, салат «Айсберг».

МУК К002-23

При этом массовую долю ДНК в пробе с добавкой W_D , мкг/кг, рассчитывают по формуле

$$W_D = \frac{C_{исх.p-ра} \cdot V_{доб}}{m_{нав} + V_{доб} \cdot \rho_{р-ля}}, \quad (B.5)$$

где $C_{исх.p-ра}$ – массовая концентрация ДНК в растворе, вводимом в пробу в качестве добавки, нг/см³;

$m_{нав}$ – масса навески пробы, г;

$V_{доб}$ – объем аликвоты раствора ДНК, вводимого в пробу в качестве добавки, см³;

$\rho_{р-ля}$ – плотность реактивов, входящих в состав растворителя (вода), принята равной 1 г/см³.

Границы погрешности величины добавки при доверительной вероятности $P=0,95$ (без учета знака), Δ_D , мкг/кг, рассчитывают по формуле

$$\Delta_D = W_D \sqrt{\left(\frac{\Delta C_{исх. p-ра}}{C_{исх. p-ра}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_{доб}}{V_{доб}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta m_{нав}}{m_{нав}}\right)^2}, \quad (B.6)$$

где W_D – массовая доля ДНК в пробе с добавкой, мкг/кг;

$\Delta C_{исх. p-ра}$ – характеристика погрешности приготовления растворов ДНК, вводимых в пробу в качестве добавки, нг/см³;

$\Delta V_{доб}$ – характеристики погрешности мерной посуды, применяемой для взятия аликвот растворов микотоксинов, вводимых в пробу в качестве добавки, см³;

$\Delta m_{нав}$ – характеристика погрешности весов, применяемых для взвешивания пробы, г.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

(обязательное)

Полный бюджет неопределенности

Для оценки полного бюджета неопределенности измерений методики в качестве исследуемых образцов были проведены измерения референтных материалов *L. monocytogenes* (п. 5.2 настоящей методики), значений 0,00247 нг/см³, 0,0247 нг/см³, 0,247 нг/см³.

Получены результаты измерений по форме таблицы Б.1.

Оценку источников неопределенности и вычисление значения неопределенности проводят согласно ГОСТ Р 34100.3. Расширенную неопределенность измерения массовой концентрации ДНК *L. monocytogenes* вычисляют по формуле:

Суммарную неопределенность измерения массовой концентрации *L. monocytogenes* вычисляют по формуле

$$u_c = \sqrt{u_A^2(b_{List}) + u_B^2(b_{List})} \quad (Г.2)$$
Неопределенность типа А

Неопределенность типа А вычисляют по формуле:

$$u_A(b_{List}) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{n=16} (b_j - \bar{b})^2}{n(n-1)}}, \quad (Г.3)$$

где b_j – j -ое измерение массовой концентрации ДНК *L. monocytogenes*;

\bar{b} – среднее значение измерений массовой концентрации;

n – количество измерений массовой концентрации ДНК *L. monocytogenes* в анализируемом образце.

Неопределенность типа В

Основываясь на измерительной модели, учитывая приведенные ниже источники неопределенности, которые считают значимыми и берут в рассмотрение, неопределенность типа В оценивают по формуле (Г4):

$$u_B(b_{List}) = \sqrt{u_B^2(CI) + u_B^2(l) + u_B^2(CO) + u_B^2(D) + u_B^2(m) + u_B^2(reag) + u_B^2(op)} \quad (Г.4)$$

где вклады в неопределенность:

- неопределенность от измерения оптической плотности, вносимая средством
- и
- з - неопределенность от измерения длины оптического пути $u_B(l)$;
- м - неопределенность, присущая стандартным образцам (референтным материалам),
- е

МУК К002-23

применяемым для калибровки ($u_B(CO)$);

- неопределенность от фактора разбавления $u_B(D)$, включающего неопределенность измерения объема реагентов автоматическими дозаторами ($u_B(V_D)$) и неопределенность от

и

в

неопределенность от чистоты реагентов ($u_B(reag)$);

о - неопределенность, вносимая оператором ($u_B(op)$).

Неопределенность от измерений оптической плотности (берется из сертификата на спектрофотометр).

в Неопределенность от измерений оптической плотности берется из сертификата на спектрофотометр и вычисляется по следующей формуле:

$$u_{СИ} = \frac{U_{СИ}}{k} \quad (Г.5)$$

где: $u_{СИ}$ – неопределенность от измерений оптической плотности;

$U_{СИ}$ – расширенная неопределенность из сертификата на спектрофотометр;

k – коэффициент охвата из сертификата на спектрофотометр.

в

2 Неопределенность измерения длины оптического пути

о

Учитывают неопределенность, приведенную в сертификатах на кюветы (U_l).

в

Неопределенность от измерения длины оптического пути u_l рассчитывают,

т

основываясь на следующей формуле:

ь

$$u_l = \frac{U_l}{k} \quad (Г.6)$$

р

о

3 Неопределенность, присущая стандартным образцам (референтным материалам), применяемым для калибровки ($u_B(CO)$) берется из сертификата на референтные материалы.

т

г

4 Неопределенность измерения фактора разбавления

в

Фактор разбавления рассчитывают, основываясь на следующей формуле:

в

$$D = \frac{V_k + V_D}{V_D} \quad (Г.7)$$

м

Учитывают погрешность/неопределенность, приведенную в сертификатах на дозаторы, неопределенность мерных колб.

р

Неопределенность от фактора разбавления $u_B(D)$ в общем виде рассчитывают, основываясь на следующей формуле:

к

и

$$u_B(D) = \sqrt{\left(\frac{\partial D}{\partial V_{100}} u_{V_{100}}\right)^2 + \left(\frac{\partial D}{\partial V_1} u_{V_1}\right)^2 =}$$

я

$$= \sqrt{\left(\frac{1}{V_1} u_{V_{100}}\right)^2 + \left(\frac{1}{V_1} u_{V_1}\right)^2} \quad (Г.8)$$

б

м

Учитывают погрешность/неопределенность, приведенную в сертификатах на дозаторы и колбы мерные, участвующие в приготовлении разбавлений.

м

и

и

$u_B(V_k)$

МУК К002-23

5 Неопределенность от измерения массы реагентов $u_B(m)$ берется из сертификата на весы с учетом взятия конкретной навески.

Неопределенность от чистоты реагентов ($u_B(reag)$) берется из сертификатов на реагенты.

Неопределенность, вносимая оператором ($u_B(op)$), оценивается экспериментально.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

(справочное)

**Пример приготовления стандартных растворов, растворов для добавок
и образцов для оценивания**

Раствор ДНК из образца, принятого референтным, помещают в кювету спектрофотометра для определения массовой концентрации (нг/см³) ДНК *L. monocytogenes*. Пробу готовят следующим образом: 0,1 см³ раствора ДНК вносят в кювету спектрофотометра, далее в кювету добавляют 0,9 см³ Tris-HCl буфера, pH 7,5. В этих условиях двуспиральная структура ДНК сохраняется в нативном виде, ее концентрацию измеряют с использованием переводного коэффициента 50 (с учетом перевода в нг/см³ – 50000) [2, 3]. Концентрацию ДНК в растворе рассчитывают по формуле:

$$C_1 = F \times (D_{260} - D_{320}) \times 50000 \quad (\text{Д.1})$$

где

D_{260} – оптическая плотность раствора ДНК при 260 нм;

D_{320} – оптическая плотность раствора ДНК при 320 нм;

F – коэффициент разбавления равный 10;

50000 – переводной коэффициент, нг/см³.

В ходе эксперимента выполняют 4 измерения в условиях повторяемости, далее рассчитывают среднее арифметическое \bar{X} результатов измерений

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{N} \quad (\text{Д.2})$$

где

X_i – результат единичного анализа i ;

N – количество измерений.

*Примечание – При оформлении результатов измерения принимают, что геном-эквивалент (ГЭ/см³) соответствует 1 молекуле ДНК (геному, копии) *L. monocytogenes* в см³. Перевод массовой концентрации в геном-эквиваленты и обратно осуществляют с учетом размера генома *L. monocytogenes* равного 2972250 bp (пар оснований) [4] и массы 1 пары оснований равной $1,023 \times 10^{-9}$ нг [5], таким образом вес одной молекулы ДНК *L. monocytogenes* составляет $3,04061 \cdot 10^{-6}$ нг.*

Результаты расчета массовой концентрации ДНК в растворе № 1 приведены в таблице Д.1.

Таблица Д.1 – Массовая концентрация ДНК в растворе № 1

Количество измерений	Оптическая плотность растворов ДНК			Массовая концентрация ДНК, C_1 , нг/см ³	ГЭ/см ³ , $\times 10^{10}$
	D ₂₆₀	D ₃₂₀	$\Delta_{(D_{260} - D_{320})}$		
1	0,520	0,032	0,488	244000,0	8,02
2	0,551	0,041	0,510	255000,0	8,39
3	0,524	0,035	0,489	244500,0	8,04
4	0,530	0,038	0,492	246000,0	8,09

Среднее значение (\bar{X}) массовой концентрации ДНК в растворе № 1 составляет $C_1 = 247375,0$ нг/см³, что соответствует $8,14 \times 10^{10}$ ГЭ/см³.

Растворы для добавки ДНК *L. monocytogenes* готовят последовательным разбавлением раствора № 1.

Для приготовления раствора ДНК № 2 аликвоту раствора № 1 объемом $V_{C_1} = 0,1$ см³ с помощью мерной пипетки переносят в мерную колбу вместимостью $V_{100} = 100$ см³, доводят до метки деионизированной водой и тщательно перемешивают.

Концентрацию раствора ДНК *L. monocytogenes* № 2, C_2 , нг/см³, рассчитывают по формуле:

$$C_2 = \frac{V_{C_1} \cdot C_1}{V_{100}} \quad (\text{Д.3})$$

$C_2 = 247,4$ нг/см³, что соответствует $8,14 \times 10^7$ ГЭ/см³.

Для приготовления раствора ДНК № 3 аликвоту раствора № 2 объемом $V_{C_2} = 1$ см³ с помощью мерной пипетки переносят в мерную колбу вместимостью $V_{100} = 100$ см³, доводят до метки деионизированной водой и тщательно перемешивают.

Концентрация раствора ДНК № 3, C_3 , мкг/см³, рассчитывают по формуле

$$C_3 = \frac{V_{C_2} \cdot C_2}{V_{100}} \quad (\text{Д.4})$$

$C_3 = 2,47$ нг/см³, что соответствует $8,14 \times 10^5$ ГЭ/см³.

Для приготовления раствора ДНК № 4 аликвоту раствора № 3 объемом $V_{C_3} = 1$ см³ с помощью мерной пипетки переносят в мерную колбу вместимостью $V_{10} = 10$ см³, доводят до метки деионизированной водой и тщательно перемешивают.

Концентрация раствора ДНК № 4, C_4 , мкг/см³, рассчитывают по формуле

$$C_4 = \frac{V_{C_3} \cdot C_3}{V_{10}} \quad (\text{Д.5})$$

$C_4 = 0,247$ нг/см³, что соответствует $8,14 \times 10^4$ ГЭ/см³.

Растворы ДНК № 1 – 4 должны храниться при температуре не выше минус 18 °С не более года. Схема приготовления растворов для добавок представлена в таблице Д.2.

МУК К002-23

Таблица Д.2 – Схема приготовления растворов для добавок

Текущий раствор, №	Раствор, взятый для приготовления текущего раствора, №	Объем раствора более высокой концентрации, взятый для приготовления текущего раствора $V_C, \text{см}^3$	Объем колбы для приготовления текущего раствора $V_k, \text{см}^3$	Концентрация ДНК в текущем растворе $C_C, \text{нг/см}^3$
1	-	-	-	247375,0
2	1	0,1	100	247,4
3	2	1	100	2,47
4	3	1	10	0,247

Добавки растворов ДНК *L. monocytogenes* вносятся следующим образом: аликвота раствора ДНК в соответствии с таблицей Д.3 вносится в пробирки вместимостью 1,5 см³, содержащие навески 1 г гомогенизированного исследуемого образца. Содержимое пробирок тщательно перемешивают на вортексе и проводят процедуру экстракции и подготовки образцов как описано в методике измерений. Массовая концентрация ДНК в пробах должна соответствовать данным таблицы Д.4.

Таблица Д.3 – Растворы ДНК и их аликвоты, использованные для внесения добавок

Проба	Уровни измерений								
	1			2			3		
	Раствор	$C_m, \text{нг/см}^3$	$V_m, \text{см}^3$	Раствор	$C_m, \text{нг/см}^3$	$V_m, \text{см}^3$	Раствор	$C_m, \text{нг/см}^3$	$V_m, \text{см}^3$
1, 2	4	0,247	0,01	4	0,247	0,10	2	247,4	0,01

Таблица Д.4 – Массовая концентрация ДНК в пробах для проведения эксперимента

Проба	Уровни измерений					
	1		2		3	
	Массовая конц. ДНК в пробах с добавкой, $W_{REF}, \text{нг/см}^3$	$\Gamma\text{Э/см}^3$	Массовая конц. ДНК в пробах с добавкой, $W_{REF}, \text{нг/см}^3$	$\Gamma\text{Э/см}^3$	Массовая конц. ДНК в пробах с добавкой, $W_{REF}, \text{нг/см}^3$	$\Gamma\text{Э/см}^3$
1, 2	0,00247	814	0,0247	8140	2,47	814000

БИБЛИОГРАФИЯ

- [1] ISO 11290-1:2017. Микробиология пищевой цепи. Горизонтальный метод выявления и подсчета бактерий *Listeria monocytogenes* и *Listeria spp.* Часть 1. Метод выявления.
- [2] ГОСТ Р ИСО 21571-2014. Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Экстракция нуклеиновых кислот.
- [3] Green, M.R. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. – 4th ed. / M.R. Green, D. Russell. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – p. 999. [SBN 978-0879695-76-7](#).
[Молекулярное клонирование. Лабораторное руководство]
- [4] Organism Overview. *Listeria monocytogenes* [Электронный ресурс] // URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Listeria+monocytogenes> (дата обращения: 11.11.2022)
[*Listeria monocytogenes*. Обзор]
- [5] Dolezel, J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human / J. Dolezel, J. Bartos, H. Voglmayr, J. Greihuber. *Cytometry Part A.*, 2003. – Vol. 51. – P. 127-128.
[Содержание ядерной ДНК и размер генома форели и человека]

УДК

Ключевые слова: *L. monocytogenes*, пищевые продукты, петлевая изотермическая амплификация, ДНК
