



FAST-FOX® LISTERIA-LAMP

набор реагентов для идентификации возбудителя
листериоза (*Listeria Monocytogenes*) методом петлевой
изометрической амплификации

Версия 07-2021



Видеоинструкция на YouTube:

<https://www.youtube.com/watch?v=5yQTtp99ToM&list=PLHg-UynxQsK6noneK-bTiqkJIdankGNyL>

Анализ *in vitro*

Хранить при 2-8°C

Пожалуйста, по вопросам технической поддержки и дополнительной информации обращайтесь к производителю или официальному дистрибьютору на территории Вашей страны:



Производитель:
ОДО "КомПродСервис"
ул. Филимонова, 25Г, г. Минск
+375 17 336 50 54
info@komprod.com
www.komprod.com

Техническая поддержка
support@komprod.com
+375 17 336 50 54

Официальный дистрибьютор в России:

ООО "НеоТест"
ул. РаSTOPчина, 1Г, г. Владимир
+7 499 649 02 01
info@neo-test.ru
www.neo-test.ru

Техническая поддержка
support@neo-test.ru
+7 499 704 05 50



FAST-FOX®LISTERIA-LAMP

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система представляет собой набор реагентов для проведения петлевой изотермической амплификации (LAMP) с целью качественного выявления ДНК *Listeria monocytogenes* в биологическом материале и пищевых продуктах (мясе, мясных полуфабрикатах, молоке, сырах овощах, а также в воде, почве, кормах). Анализ результатов проводят визуально по изменению окраски реакционной смеси в ходе инкубирования.

Набор реагентов выпускается в двух комплектациях:

Комплект 1 – набор реагентов «Fast Fox®Listeria-LAMP», рассчитанный на проведение 50 определений (50 образцов), включая контроли;

Комплект 2 – набор реагентов «FastFox®Listeria-LAMP» с раствором для экстракции ДНК, рассчитанный на проведение 50 определений (50 образцов), включая контроли.

В случае необходимости, перед проведением анализа, возможен этап предварительного обогащения анализируемых проб (п. 6.1), обеспечивающий биологическое накопление возбудителя.

2. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Аналитическая чувствительность: 10 геном-эквивалентов *L. monocytogenes* (в 25 мкл реакционной смеси, что соответствует содержанию примерно 80 геном-эквивалентов в 100 мкл матрицы).

Аналитическая специфичность:

Набор реагентов специфически обнаруживает фрагмент ДНК *L. monocytogenes*. Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании различных штаммов *L. monocytogenes*. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих микроорганизмов: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahlia*, *Pseudomonas syringae*, *Sclerotinia sclerotiorum*. При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов неспецифических (ложноположительных) реакций выявлено не было.

3. СОСТАВ НАБОРА

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

* – раствор входит в состав комплектации 2-го набора.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Постановку реакции следует производить, как это принято при работе с потенциально инфекционным материалом. С соблюдением санитарных норм и правил «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденными Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 2 от 06.01.2017 г.

Работа проводится только в одноразовых перчатках, используются одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) после использования обеззараживается 3 – 5% раствором перекиси водорода в специальных контейнерах, после чего разрешается слив в общую канализационную сеть.

Постановку LAMP осуществляют в 2 рабочих зонах. Зона 1 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) – выделение ДНК из проб биологического материала. Зона 2 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) – подготовка проб и контролей, внесение проб в микропробирки с LAMP-реагентам, постановка реакции и анализ результатов.

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

Пипетки или наконечники должны иметь аэрозольный барьер. Перчатки и халаты меняют при переходе из одной зоны в другую. Поверхности столов, а также помещения, где проводится постановка LAMP-реакции, должны обязательно до начала и после окончания работ обрабатываться ультрафиолетовым светом.

Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

Не использовать набор по истечению срока годности.

5. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЮЩИЕСЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНО

- 5.1 Набор для экстракции ДНК из биологического материала и суспензии пищевых продуктов (возможно использование различных способов для экстракции материала, в частности преципитационные методы, методы температурного, щелочного лизиса и пр.).
- 5.2 Настольный бокс с бактерицидной лампой (например, «Biosom» или любой другой марки) либо стерильный ламинарный шкаф (например, Kojair KR-125 Safety или любой другой марки).
- 5.3 Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 25 – 100°C (например, «Biosom» или любой другой марки), либо термоциклер (например, Терцик производства «ДНК-технология», Россия; CG1-96 производства «Corbett Research», Австралия, либо аналогичный), либо водяная баня с температурным диапазоном до 65°C (любого производителя).
- 5.4 Центрифуга-вортекс (любой марки).
- 5.5 Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14 тыс. об/мин. (любой марки).
- 5.6 Вакуумный аспиратор с колбой-ловушкой (любой марки).
- 5.7 Набор автоматических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», «Gilson» либо любой другой марки).
- 5.8 Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл.
- 5.9 Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл.
- 5.10 Пробирки DNAase-free типа «Эппендорф» на 1,5 мл, на 0,5 мл или на 0,2 мл.
- 5.11 Штативы для наконечников, микропробирок (любой марки).
- 5.12 Холодильник на 2 - 8 °C и на минус 20 °C, морозильник на минус 20°C.
- 5.13 Ёмкость для сброса наконечников.
- 5.14 Среда для предварительного обогащения – бульон Фразера полуконцентрированный по ГОСТ 32031.

6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Подготовка материала для исследования (предварительное обогащение пробы).

Цель – увеличение количества клеток *L. monocytogenes*.

Среду для предварительного обогащения (бульон Фразера полуконцентрированный) подогревают до температуры (37,0±1,0)°C или (41,5±1,0)°C в зависимости от группы продуктов (готовые или сырые либо пробы, отобранные из окружающей производственной среды) согласно таблице 1.

В асептических условиях в каждый пакет с фильтром или колбу помещают необходимое количество среды для предварительного обогащения и количество пробы продукции или пробы из окружающей среды согласно таблице 1.

Затем тщательно перемешивают содержимое пакета или колбы в течение 2 мин.

Инкубируют в термостате при температуре (37,0±1,0)°C или (41,5±1,0)°C согласно таблице 1.

Таблица 1 – Обогащение пробы для обнаружения бактерии *L. monocytogenes*

Наименование продукции, от которой отобрана проба	Количество пробы, г	Объем среды (бульона Фразера), мл	Температура инкубирования, °С	Время инкубирования, ч
Готовые продукты из мяса	25	225	(37,0±1,0)	18-24
Продукты из мяса (сырые)	25	225	(41,5±1,0)	18-24
Объекты окружающей производственной среды	1 губка (спонж)	100	(41,5±1,0)	24-30
	1 тампон	10	(41,5±1,0)	24-30

6.2 Выделение ДНК проводится в Зоне 1 с использованием набора реагентов, согласно инструкции производителя и с использованием ВКО из данного набора.

Процедура выделения ДНК с использованием раствора для экстракции материала, входящего в набор FAST-FOX® LISTERIA-LAMP:

1. смешайте раствор для экстракции с пробой в соотношении 1:1 (например, 100:100 мкл);
2. инкубируйте смесь в течение 5 мин при 95°С в твердотельном термостате или на водяной бане; в процессе инкубации встряхивайте смесь на вортексе 2-3 раза;
3. центрифугируйте смесь при 10000 об/мин в течение 5 мин;
4. используйте надосадочную жидкость для проведения анализа.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ – Пробы, не прошедшие должную температурную обработку во время этапа выделения ДНК, могут представлять биологическую опасность, при работе с такими пробами следует соблюдать соответствующие меры безопасности.

6.3 Постановка LAMP – проводится в Зоне 2.

Для постановки петлевой изометрической амплификации необходимо использовать прозрачные тонкостенные микропробирки объемом на 0,5 мл или на 0,2 мл.

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК, полученных в результате выделения, используются одноразовые наконечники с аэрозольным барьером.

6.3.1 LAMP смесь-1/L.m., отрицательный контрольный образец, праймеры List, праймеры ВКО и положительный контрольный образец достать из морозильника, разморозить, тщательно перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки и поместить на хладоэлемент либо на ледяную баню.

6.3.2 Смешать в чистых отдельных пробирках реагенты из расчета необходимого числа реакций, включающего тестирование исследуемых и контрольных образцов.

В двух пробирках объемом 1,5 мл приготовить два «общего микса» для обнаружения ДНК *L. monocytogenes* и для обнаружения ВКО в образце. Из расчёта на N выделений смешать 12,5*(N+1) мкл LAMP смесь-1/L.m. и 7,5*(N+1) мкл праймеров List и такое же количество, но с добавлением праймеров ВКО вместо праймеров List. Аккуратно перемешать, разнести по 20 мкл в пробирки для проведения ПЦР.

Количество реакций	LAMP-смесь-1/L.m., мкл	Праймеры ВКО/List, мкл
1	12,5	7,5
10	137,5	82,5

Используя наконечники с фильтром добавить по 5 мкл ДНК исследуемых образцов, а также отрицательный и положительный контроли экстракции и амплификации (К+ и К-: по 5 мкл ПКО и ОКО соответственно). При этом добавление ДНК исследуемых образцов дублируется и вносится в пробирки с праймерами List и праймерами ВКО. Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием. Общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл, включая объем пробы ДНК/ОКО/ПК.

Установить температуру водяной бани на 65°C, либо запрограммировать термоциклер и осуществить инкубирование в соответствии с режимом, указанным в таблице ниже:

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

Анализ результатов проводят визуально, оценивая цвет реакционной смеси после завершения времени инкубирования. Изменение изначального цвета – насыщенно желтый – реакционной смеси на насыщенно пурпурный говорит о присутствии в исследуемом образце искомой ДНК *L. monocytogenes* (пробирка с праймерами List) или об отсутствии ингибирования LAMP-реакции (пробирка праймеры ВКО). Сохранение насыщенного желтого цвета реакционной смеси свидетельствует об отсутствии ДНК

L. monocytogenes в исследуемом образце (пробирка с праймерами List) или о наличие ингибирования реакции (пробирка праймеры ВКО). Анализ результатов может проводиться только в случае положительной реакции данного образца в пробирке с праймерами ВКО.

7. ФОРМА ВЫПУСКА

Тест-система для идентификации возбудителя листериоза *L. monocytogenes* методом петлевой изометрической амплификации выпускается в виде набора. Тест-система рассчитана на проведение 50 исследований, включая контроли.

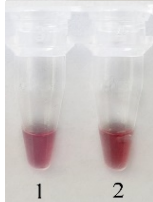
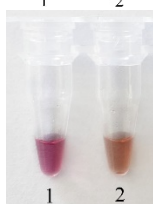
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Тест-систему хранят при -20 ± 2 °С. Раствор для экстракции материала необходимо хранить при температуре от 2°C до 8°C. Транспортирование тест-системы должно производиться при температуре $2,0\pm 2$ °С в течение 5 суток.

Срок годности тест-системы – 12 месяцев с даты изготовления.

Интерпретация результатов анализа

Пример положительной и отрицательной пробы



Начало реакции.

1 – пробирка с праймерами ВКО

2 – пробирка с праймерами List

Конец реакции.

Цвет поменялся только в пробирке с праймерами ВКО.

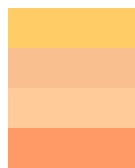
ДНК *L. monocytogenes* в образце – **нет**

Конец реакции.

Цвет поменялся в обеих пробирках, как с праймерами ВКО, так и с праймерами List.

ДНК *L. monocytogenes* в образце – **есть**

Образцы цвета для визуальной оценки результатов анализа



Отрицательные образцы



Положительные образцы