Gebrauchsanweisung

AMODIA DetectLine

Basic

Testsystem

zum Nachweis von

Amplifikationsprodukten

auf Basis des AMODIA-LFD
(LFD: Lateral-Flow Dipstick)

Σ
100

REF:
ADL-B01

AMODIA Bioservice GmbH

Vertrieb durch:

AMODIA Bioservice GmbH

Rebenring 31
D-38106 Braunschweig
Germany

Tel.: +49 (0) 531-260 17 64
Fax: +49 (0) 531-260 17 66

E-mail: info@amodia.de
Internet: http://www.amodia.com

Inhaltsverzeichnis

Erläuterung der Symbole....2
Testbeschreibung....3
Kitbestandteile, Lagerung und Stabilität....3
Erforderliche Chemikalien....3
Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel....3
Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen....3
Leistungsdaten....4
Produktdetektion....4
1.1 Detektion....4
1.2 Auswertung....5
Trouble-Shooting Detektionsverfahren....6
Methodik / Testprinzip....6
Anlage....6

Erläuterung der Symbole

Symbol	Erklärung
	Haltbarkeitsdatum
IVD	In Vitro Diagnostikum
LOT	Los-Bezeichnung
REF:	Artikel-Nummer
+ 8 °C / + 2 °C	Lagerungsbedingungen

Symbol	Erklärung
	Gebrauchsanweisung beachten
	Begleitdokumente beachten
Σ	Packungsgröße
	Hersteller
	Nur zur Leistungsbewertung

Testbeschreibung

Beim AMODIA DetectLine Basic handelt es sich um ein Detektionssystem für doppelt markierte Amplifikationsprodukte. Das auf der Testlinie detektierte Produkt muss mit Biotin und FITC/FAM markiert sein. Wir empfehlen, die Amplifikationsreaktion mit lediglich einem markierten Primer einzusetzen und anschließend mit einer markierten Sonde zu hybridisieren.

Der Testkit enthält keine Materialien zur Erzeugung der Amplifikationsprodukte.

Kitbestandteile, Lagerung und Stabilität

Komponente	Art-Nr.	Inhalt (48 Tests)	Vorbereitung	Lagerung	Haltbarkeit / Stabilität
Detektion					
Lateral Flow Dipsticks	LFD01	4 Dosen a 25 Stk.	gebrauchsfertig	2 - 8°C	Bis zum Verfallsdatum; 60 Tage nach Öffnen*
Chromatographie-Puffer [Chromatographic Buffer]	ChB01	2 Fl. a 10 ml	gebrauchsfertig	2 - 8°C	Bis zum Verfallsdatum; 60 Tage nach Öffnen

* : LFD-Dose muss fest verschlossen sein ! Lagerung bei geöffneter LFD-Dose verringert die Haltbarkeit der LFDs.

Wichtiger Hinweis:
Die Zeiten für Haltbarkeit und Stabilität sollten nicht überschritten werden.

Erforderliche Chemikalien

Keine

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

- Variable Pipetten für 10 µl und 1.000 µl (jeweils getrennte Pipetten für Extraktion, Amplifikation und Detektion)
- Pipettenspitzen mit Kontaminationsschutz (Filter)
- Mikrotiterplatte

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Alle Reagenzien dieser Testpackung dürfen ausschließlich zu der spezifizierten Diagnostik verwendet werden. Die Anwendung sollte durch Personal erfolgen, das speziell in diesen Verfahren unterrichtet und ausgebildet wurde.

Bei der Durchführung des Tests ist das vorgeschriebene Protokoll unbedingt einzuhalten.

Die Lagerung der Reagenzien sollte in den Originalgefäßen bei den angegebenen Temperaturen erfolgen. Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testbestecke dürfen nicht ausgetauscht werden. Die angegebenen Verfalls- und Haltbarkeitsdaten sind zu beachten.

Für den Umgang mit Kitreagenzien und Probenmaterialien sind die Vorschriften zur Unfallverhütung für den Gesundheitsdienst einzuhalten. Insbesondere sind folgende Vorsichtsmaßregeln zu beachten:

- nicht essen, trinken oder rauchen
- Pipetten mit Kontaminationsschutz verwenden
- Schutzkleidung und Handschuhe tragen
- Kontakt mit Reagenzien und Probenmaterial vermeiden

Einige der Reagenzien dieses Testkits enthalten Substanzen zum Schutz gegen mikrobielles Wachstum; daher ist die Berührung mit der Haut und/oder Schleimhäuten zu vermeiden.

Die Fläschchen können mit dem normalen Labormüll entsorgt werden.

Leistungsdaten

Lieferant: AMODIA Bioservice GmbH
Bestell-Nr.: ADL-B01
Packungsgröße: 100 Bestimmungen
Lieferung: ab Lager in Braunschweig, Deutschland
Lagerung: siehe "Kitbestandteile, Lagerung und Stabilität"

Testzeit und Ablauf:

Detektion und Auswertung	ca. 15 Minuten

Produktdetektion

Achtung:
- Die Komponenten aus Test-Kits verschiedener Chargen nicht vertauschen.
- Die Produktdetektion unbedingt an einem vom Amplifikationsbereich getrennten Arbeitsplatz durchführen (**Post-Amplifikationsbereich**).

Für die Detektion werden **Lateral-Flow Dipsticks** (s. Abb. 1) verwendet. Diese bestehen aus dem Probenapplikations-bereich (lila), der Membran und dem Absorptionsbereich (weiß). Bis auf den unteren Teil des Applikationsbereichs ist der gesamte Streifen mit Folie überklebt und kann auf der Folie berührt werden. Auf der Folie über dem Absorptionsbereich können Beschriftungen angebracht werden.

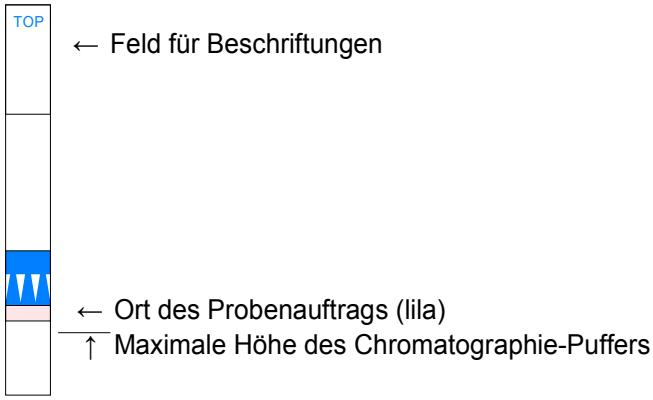

Abb. 1: Aufbau der Lateral-Flow Dipsticks

1.1 Detektion

	Arbeitsschritte Detektion
1.	Die erforderliche Anzahl Streifen aus der Packung nehmen, beschriften und bereit legen. Nur die mit Folie bedeckten Bereiche berühren und beschriften. LFD-Dose wieder fest verschließen.
2.	Für jede Probe **150 µl Chromatographiepuffer ChB01** in einzelne Reaktionsgefäße oder in Vertiefungen einer Mikrotiterplatte vorlegen.
3.	**5 - 10 µl** der Lösung, die das doppelt markierte Amplifikationsprodukt enthält, auf dem oberen Ende des Applikationsbereichs (lila) an der Folienkante auftragen. Ein Verlaufen ist dabei normal. Mindestens **1 min** inkubieren lassen.
4.	Die Streifen mit der Membran in die in Schrit 2 hergestellten Chromatographiepuffer stellen und solange stehenlassen, bis der Applikationsbereich entfärbt ist (mind. **20 min**). Die Kontroll-Linie muss entwickelt sein. Das Ergebnis nicht vor Ablauf der Entwicklungszeit ablesen. Die Linien sind stabil und können auch später abgelesen werden.

1.2 Auswertung

1.	Es werden **zwei** rote Linien sichtbar: Test-Linie und Kontroll-Linie **Achtung**: Auch eine schwach gefärbte Test-Linie ist als positiv zu werten. Zum Abgleich die PCR Negativkontrolle heranziehen. Gegebenenfalls ist der Test zur Bestätigung zu wiederholen. Positive Resultate können schon vor Ablauf der Entwicklungszeit sichtbar sein.	Der Nachweis auf das doppelt markierte Amplifikationsprodukt ist **positiv.**
2.	Es tritt nur **eine** rote Linie auf Höhe der Kontroll-Linie auf. **Achtung**: Der Applikationsbereich darf keine nennenswerte lila-Färbung mehr aufweisen, bevor das Ergebnis abgelesen wird.	Der Nachweis auf das doppelt markierte Amplifikationsprodukt ist **negativ.**

Der Test ist nur gültig, wenn bei jeder untersuchten Probe die Kontroll-Linie gefärbt ist.

Für den jeweiligen Testdurchgang müssen die mitgeführten **Positiv- und Negativkontrollen** korrekt sein, um das Testergebnis werten zu können.

Die Linie der **Positivkontrolle** muss **deutlich sichtbar** sein.

Sowohl bei der **PCR-Negativkontrolle** als auch der **Extraktionskontrolle** darf **keine** gefärbte **Testlinie sichtbar** sein. Falls eine gefärbte Bande auftritt, muss die Analyse für **sämtliche** parallel getesteten Proben wiederholt werden.

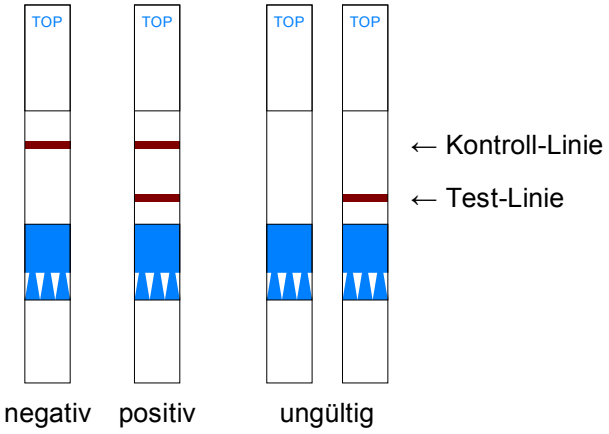

Abb. 2: Auswertung der Lateral-Flow Dipsticks

Der Testkit liefert ausschließlich ein qualitatives Ergebnis. Die Stärke der Färbung der Testlinie erlaubt keine direkten Rückschlüsse auf die Anzahl der Zellen in einer positiven Probe.

Trouble-Shooting Detektionsverfahren

Problem	Mögliche Ursache	Empfehlung
Keine sichtbare Kontroll-Linie.	a) Falscher oder nicht mehr funktionsfähiger Chromatographiepuffer	Neue Chemikalien verwenden.
	b) Haltbarkeit der Teststreifen überschritten	Neue Teststreifen verwenden.
	c) Falsche Lagerung der Teststreifen	**Lagerung bei 2 - 8°C.**
Sämtliche Proben und die Positivkontrolle zeigen ein negatives Signal.	a) Amplifikation nicht erfolgreich	Amplifikationsprodukte auf einem 2% Agarosegel auftragen.
	b) Markierung der Amplifikationsprodukte nicht erfolgreich	Bedingungen der Markierung überprüfen.
Sämtliche Proben und die Negativkontrolle zeigen ein positives Signal.	a) Kontamination mit Ziel-Organismus oder mit Amplifikationsprodukt	Reinigung von Pipetten und Arbeitsplatz. Verwendung neuer Pipettenspitzen, Spitzenkästen und Handschuhe.
	b) Chromatographiepuffer kontaminiert	Neuen Chromatographiepuffer verwenden.
	c) Andere Lösungen kontaminiert	Neue Lösungen verwenden.

Methodik / Testprinzip

Die Detektion der doppelt markierten Amplifikationsprodukte erfolgt mit einem immunochromatografischen Verfahren auf einem Lateral-Flow-Streifen. Diese Amplifikationsprodukte binden einerseits an einen Antikörper, der auf Gold-Partikeln immobilisiert ist. Durch die Diffusion des Chromatographiepuffers diffundiert dieser Komplex durch die Membran. Die Membran ist mit zwei Linien von Antikörpern beschichtet. An der ersten Linie werden die Moleküle gebunden, die auch die zweite Markierung enthalten. Durch die Bindung werden die Gold-Partikel aufkonzentriert und formen eine sichtbare rote Linie. Gold-Konjugate ohne Amplifikationsprodukt diffundieren weiter und binden an den zweiten Antikörper. Dadurch wird hier eine zweite Linie sichtbar, die als Kontrolle für den korrekten chromatografischen Ablauf dient.
Die Empfindlichkeit der Detektion ist vergleichbar bzw. etwas besser als der Nachweis von DNS auf einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel (Nachweis von ca. 10 ng DNS).

Anlage

- Vorlage PCR-Mastermix und LFD Dokumentation