

Gebrauchsanweisung

AMODIA



**easyFlow®
Bacteria**

Molekulares Testsystem

zum Nachweis der

RNA von Bakterien



50

REF:
AEF-B01



Vertrieb durch:

AMODIA Bioservice GmbH

Rebenring 31
D-38106 Braunschweig
Germany




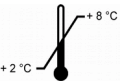
Tel.: +49 (0) 531-260 17 64
Fax: +49 (0) 531-260 17 66

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

Inhaltsverzeichnis

Erläuterung der Symbole.....	2
Einleitung.....	3
Testbeschreibung.....	3
Kitbestandteile, Lagerung und Stabilität.....	3
Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel.....	3
Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen.....	4
Leistungsdaten.....	4
Beispiele für flüssige Anreicherungskulturen.....	5
Testdurchführung.....	5
1. Vorbehandlung.....	5
2. Hybridisierung.....	6
2.1 Herstellung Hybridisierungs-Mix.....	6
2.2 Hybridisierungsreaktion.....	7
3. Detektion auf Lateral-Flow-Strips.....	7
3.1 Detektion.....	8
3.2 Auswertung.....	8
Methodik / Testprinzip.....	9
1.) Probenvorbereitung.....	9
2.) Hybridisierung.....	9
3.) Detektion.....	9
Trouble-Shooting.....	9
Anlage.....	9

Erläuterung der Symbole

Symbol	Erklärung
	Haltbarkeitsdatum
	In Vitro Diagnostikum
	Los-Bezeichnung
REF:	Artikel-Nummer
	Lagerungsbedingungen

Symbol	Erklärung
	Gebrauchsanweisung beachten
	Begleitdokumente beachten
	Packungsgröße
	Hersteller
	Nur zur Leistungsbewertung

Einleitung

Die easyFlow® Methode basiert auf dem Nachweis ribosomaler RNA von Bakterien durch eine Hybridisierung mit spezifischen Sonden. Diese Sonden binden an Abschnitte der 16S rRNA, die für Bakterienspezies so charakteristisch wie ein Fingerabdruck sind. Da die RNA in toten Zellen schnell abgebaut wird, werden durch dieses Verfahren nur vermehrungsfähige (bzw. "vor kurzem noch lebende") Zellen nachgewiesen. Für den easyFlow® Testkit sind keine Amplifikationstechniken für Nukleinsäuren (z.B. PCR) erforderlich.

Testbeschreibung

Der Testkit easyFlow® Bacteria wird für die mikrobiologische Qualitätskontrolle eingesetzt. Er weist dazu die RNA von Bakterien (Domäne Bacteria) direkt aus einer Anreicherungskultur nach.

Der easyFlow® Bacteria Testkit benötigt für die Detektion der RNA der Bakterien keine Amplifikation. Nach einer Vorbereitung der zu testenden Probe wird eine Hybridisierungsreaktion mit einem Sondenmix durchgeführt. Die Detektion des hybridisierten Sonden-RNA-Komplexes erfolgt anschließend auf Lateral-Flow Dipsticks.

Kitbestandteile, Lagerung und Stabilität

Komponente	Art-Nr.	Inhalt (50 Tests)	Vorbereitung	Lagerung	Haltbarkeit / Stabilität
Hybridisierung					
Suspendierungspuffer	SB01	1 Fl. a 5,0 ml	gebrauchsfertig	Raum- temperatur	Bis zum Verfallsdatum; 60 Tage nach Öffnen
Hybridisierungspuffer (transparenter Deckel)	HBP01	1 Fl. a 1,8 ml	gebrauchsfertig	Raum- temperatur	Bis zum Verfallsdatum; 60 Tage nach Öffnen
Sondenmix (gelber Deckel)	PMB01	1 Fl. a 300 µl	gebrauchsfertig	4 - 8°C	Bis zum Verfallsdatum; 60 Tage nach Öffnen
Detektion					
Lateral Flow Dipsticks	LFD01	2 Dosen a 25 Stk.	gebrauchsfertig	4 - 8°C	Bis zum Verfallsdatum; 60 Tage nach Öffnen*
Chromatographie Puffer (blauer Deckel)	ChB01	1 Fl. a 10 ml	gebrauchsfertig	4 - 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 Haltbarkeitsdaten sollten nicht überschritten werden.

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

- Thermocycler mit Deckelheizung
- Variable Pipetten für 10 µl, 100 µl und 1.000 µl
- Ständer aus Plastik oder Aluminium, passend für die PCR-Reaktionsgefäße
- Mikrotiterplatte
- ggf. Lysozym (1 mg/ml in 10 mM TE-Puffer; pH 8,0; frisch gelöst)
- Zentrifuge für 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Pipettenspitzen mit Kontaminationsschutz (Filter)
- PCR-Probengefäße passend für den vorhandenen Thermocycler

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 Gefäße können mit dem normalen Labormüll entsorgt werden.

Leistungsdaten

Lieferant: AMODIA Bioservice GmbH
 Bestell-Nr.: AEF-B01
 Packungsgröße: 50 Reaktionen
 Lieferung: ab Lager in Braunschweig, Deutschland
 Lagerung: siehe "Kitbestandteile, Lagerung und Stabilität"
 Probenmaterial: keine Gewähr des Herstellers!

Jede Probenmatrix muss vom Anwender individuell validiert werden!

	Probenmatrix
Erforderliche Probenmenge:	1 ml aus einer flüssigen Anreicherungskultur
Analytische Spezifität:	<u>hochspezifisch für:</u> Bacteria Abdeckung von 91% der Domäne Bacteria

Testzeit ohne Anreicherungskultur und Ablauf:

Hybridisierung Vorbereitung	ca. 10 Minuten
Hybridisierung	ca. 35 Minuten
Detektion und Auswertung	ca. 15 Minuten
Testdauer insgesamt*	ca. 1 Stunde

+ : Bei Heiz- und Kühlraten von 1,5°C/s

Beispiele für flüssige Anreicherungskulturen

Vor dem Nachweis der RNA von Bakterien muss eine Anreicherungskultur durchgeführt werden. Hierfür sollten bereits validierte Verfahren unverändert eingesetzt werden. Daher enthält dieser Testkit keine Reagenzien für Anreicherungskulturen.

Zur Vermeidung von Kontaminationsproblemen wird empfohlen, sterilfiltriertes Nährmedium (0,2 µm Membranfilter) anstelle von autoklavierten Lösungen zu verwenden. Das Volumen der Anreicherungskultur kann frei gewählt werden. Die notwendige Anpassung der Volumina zeigen die folgenden Arbeitsschritte.

Arbeitsschritte Anreicherungskultur	
1.	Jeweils 1 g Produkt (~ 1 ml) in sterile Misch-Gefäße pipettieren. Dabei für jede Probe eine neue Pipettenspitze oder Transferpipette verwenden
2.	Mit Inaktivator-Lösung* auf 10 ml auffüllen.
3.	Proben für mindestens 60 s gut mischen bis eine homogene Mischung entsteht, danach für 10 - 30 min bei RT inkubieren.
Variante A: komplette Aufarbeitung (100 ml Ansatz)	
4.a	90 ml Nährmedium** in einem geeigneten Gefäß vorlegen.
5.a	10 ml Probengemisch zum Nährmedium hinzu geben und z.B. 24 Std. bei 30°C inkubieren.
Variante B: verringertes Volumen (10 ml Ansatz) (verringerte Sensitivität !)	
4.b	9 ml Nährmedium** in einem geeigneten Gefäß (z.B. 50 ml Falcon) vorlegen.
5.b	1 ml Probengemisch mit dem Nährmedium versetzen und z.B. 24 Std. bei 30°C inkubieren.

*: Lösung mit Inhaltsstoffen, die die Konservierungsmittel in der Probe inaktivieren.

** : s. Hinweis.

i Hinweis:

Nährlösungen mit Substanzen zum Inaktivieren der Konservierungsmittel in der Probe (z.B. Eugon LT Broth), sind gemäß ihrer Anleitung zu verwenden.

Testdurchführung

i Wichtige Hinweise / Vorsichtsmaßnahmen:

- Die Gefäße immer einzeln öffnen und wieder verschließen.
- Kontaminierte Handschuhe sofort wechseln.
- Reaktionsgefäße stets vorsichtig öffnen, um die Bildung von Aerosolen zu vermeiden; ggf. kurz anzentrifugieren.
- Hybridisierte Produkte (RNA, RNA-Sondenkomplex) sind als eine bedeutende potenzielle Kontaminationsquelle zu betrachten.
- Die Komponenten aus Testkits verschiedener Chargen nicht austauschen.

⚠ Achtung: Es ist darauf zu achten, das Medium nach dem Zentrifugationsschritt möglichst vollständig zu entfernen. Andernfalls kann es zu falsch-positiven Resultaten kommen.

1. Vorbehandlung

Arbeitsschritte RNA-Extraktion: Standard	
1.	Erforderliche Anzahl von sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen entnehmen, bereitstellen und beschriften.
2.	Für jede Probe 1 ml Anreicherungskultur in einzelne Reaktionsgefäße überführen. Für jede Probe eine neue Pipettenspitze verwenden! Einzelgefäße wieder verschließen!
3.	Die Proben bei 13'000g für 10 min zentrifugieren.
4.	Den Überstand vollständig von dem evtl. geformten Sediment entfernen. Für jede Probe eine neue Pipettenspitze verwenden! Einzelgefäße wieder verschließen!
5.	Mit einer neuen Filterspitze für jede Probe jeweils 100 µl Suspendierungspuffer in die Reaktionsgefäße pipettieren. Gefäße dabei einzeln öffnen und nach Zugabe sofort wieder verschließen.
6.	Das Sediment in dem Puffer durch mehrmaliges Auf- und Ab-Pipettieren suspendieren oder 10 s vortexen . Die Proben sind nun vorbereitet für die Hybridisierungsreaktion.

Für den sensitiveren Nachweis von gram-positiven Bakterien (z.B. *Staphylococcus* sp.) ist eine Lysis der Zellwände mit Lysozym möglich. Dazu müssen in **Schritt 5** der Suspendierungspuffer durch eine **Lysozym-Lösung mit 1 mg/ml in TE** (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8,0) **ersetzt** werden **und** nach dem Mischen (Schritt 6) die **Proben für 10 min bei 37 °C** inkubiert werden.

⚠ Achtung:

Es handelt sich um zwei **alternative** Protokolle! Das Protokoll für gram-positive Bakterien sollte nur eingesetzt werden, wenn die Ergebnisse mit dem Standard-Protokoll nicht zufriedenstellend sind.

2. Hybridisierung

Für die Reaktionsansätze werden pro Reaktion **30 µl Hybridisierungspuffer** und **5 µl Sondenmix** in ein steriles Reaktionsgefäß (PCR-Tube) vorgelegt. Dazu werden **100 µl lysierter Probe** aus 1.1 hinzu pipettiert. Zunächst wird ein Mastermix angesetzt. Dafür sind die Volumina der Einzelreaktionen mit der Anzahl der Reaktionen (Proben + Kontrollen + 1) zu multiplizieren.

2.1 Herstellung Hybridisierungs-Mix

Hybridisierungsmix		Beispiel Mastermix für 10 Reaktionen
Reagenzien	Menge pro Reaktion	Faktor = 11
Hybridisierungspuffer	30,0 µl	330,0 µl
Sondenmix	5,0 µl	55,0 µl
		jeweils 35 µl in jedes der 10 Gefäße dispensieren, Rest verwerfen
Anreicherungskultur bzw. Einzelkolonie in Puffer	100,0 µl	100,0 µl einzeln zugeben

Arbeitsschritte Hybridisierung	
1.	Erforderliche Anzahl von sterilen PCR-Reaktionsgefäßen entnehmen, bereitstellen und beschriften. Alle Pipettierschritte sollten zügig durchgeführt werden. Für jeden Testdurchlauf mindestens eine Negativkontrolle mitführen.
2.	Mastermix herstellen (s.o.)
3.	Jeweils 35 µl des Mastermixes in ein PCR-Reaktionsgefäß vorlegen. Einzelgefäße wieder verschließen.
4.	Mit einer neuen Filterspitze für jede Probe jeweils 100 µl Probenlösung von 1.1 in die vorgelegten Mixe pipettieren. Gefäße dabei einzel n öffnen und nach Zugabe sofort wieder verschließen.
5.	Die Kontroll-Reaktionen erhalten kein weiteres Material.

2.2 Hybridisierungsreaktion

Die Proben in den Thermocycler stellen und das Hybridisierungsprogramm starten.

i Der Test wurde auf einem Primus-Thermocycler der Firma PEQLAB entwickelt. Die Verwendung anderer Thermocycler kann eine Anpassung des Programms erforderlich machen.
Bei Fragen wenden Sie sich bitte an den Hersteller des Kits.

Programmierung des Thermocyclers

Deckelheizung auf 110°C einstellen.

Denaturierung	Temperatur*	5 min*	bei 95°C
Annealing	Rampe**	0,1 °C/s bis 50°C	
	Temperatur*	5 min*	bei 50°C
Kühlung	Temperatur*	3 min*	bei 20°C

*: Die angegebenen Zeiten sind Reaktionszeiten und beinhalten **nicht** die Abkühl- und Aufheizphasen !

** : also: **erst langsam Abkühlen von 95 auf 50°C, dann die 50°C für 5min halten.**

Die Gesamtdauer des Protokolls beträgt also ca. 25 min.

3. Detektion auf Lateral-Flow Strips

⚠ Achtung:

- Die Komponenten aus Test-Kits verschiedener Chargen nicht vertauschen.
- Die **hybridisierten RNA-Sonden Komplexe** stellen eine bedeutende **Kontaminationsquelle** dar und sollten mit größter Sorgfalt pipettiert und entsorgt werden.

Allgemeiner Ablauf

Für die Detektion werden **Lateral-Flow Dipsticks** (s. Abb. 1) verwendet. Diese bestehen aus dem Probenapplikationsbereich (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
Die Hybridisierungsprodukte werden direkt auf den Lateral-Flow Streifen pipettiert.

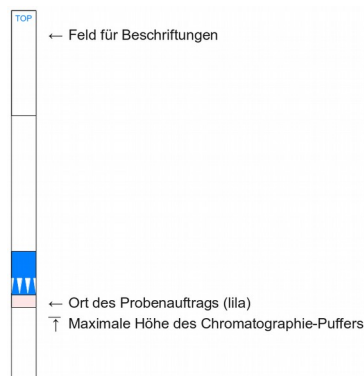


Abb. 1: Aufbau der Lateral-Flow Dipsticks

3.1 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 in einzelne Reaktionsgefäße oder in Vertiefungen einer Mikrotiterplatte vorlegen.
3.	Es werden jeweils 10 µl der Hybridisierungsprodukte auf dem oberen Ende des Applikationsbereichs (lila) an der Folienkante des LFDs auftragen.
4.	Die Streifen mit dem Bereich ohne Folie nach unten in die in Schritt 2 vorgelegten Chromatographiepuffer stellen. Nach 20 min ablesen. Sicher stellen, dass der Applikationsbereich entfärbt ist. Die Kontroll-Linie muss entwickelt sein. Das Ergebnis nicht vor Ablauf der Entwicklungszeit ablesen. Die Linien sind stabil und können auch später abgelesen werden.

3.2 Auswertung

1.	Es werden zwei rote Linien sichtbar: die Kontroll- und die Testlinie. ⚠ Achtung: Auch eine schwach gefärbte Test-Linie ist als positiv zu werten. Zum Abgleich Negativkontrolle heranziehen. Gegebenenfalls ist der Test zur Bestätigung zu wiederholen. Positive Resultate können schon vor Ablauf der Entwicklungszeit sichtbar sein.	Der Nachweis auf RNA von Bacteria ist positiv.
2.	Es tritt nur eine rote Linie auf Höhe der Laufkontroll-Linie auf. ℹ Hinweis : Die Entwicklungszeit von 20 min sollte abgewartet werden, bevor das Ergebnis abgelesen wird.	Der Nachweis auf RNA von Bacteria ist negativ.

Das Resultat des Tests ist nur gültig, wenn die Kontrolllinien für sämtliche Proben sichtbar ist.

Für jeden Testdurchgang müssen die mitgeführten **Negativkontrollen** korrekt sein, um das Testergebnis werten zu können. Falls dabei eine gefärbte Bande auftritt, muss die Analyse für **sämtliche** parallel getesteten Proben wiederholt werden.

Die getrockneten Teststreifen können auf ein Formblatt (s. Beilage) geklebt und so gelagert werden, um die Ergebnisse zu dokumentieren.

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.

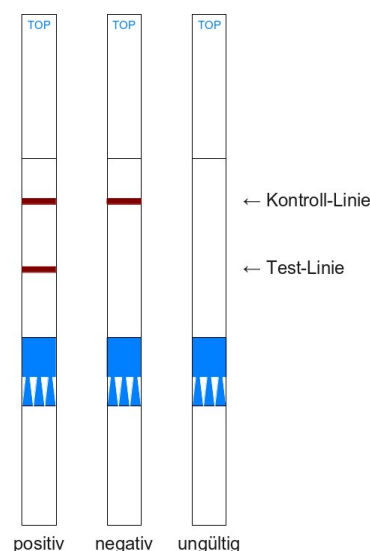


Abb. 2: Auswertung der Lateral-Flow Dipsticks

Methodik / Testprinzip

1.) Probenvorbereitung

Für den Test muss eine Anreicherungskultur durchgeführt werden, wie sie im Rahmen von Gesamtkeimzahlbestimmungen erfolgt. Durch diesen Schritt wird sicher gestellt, dass sich ausreichend Mikroorganismen für einen Nachweis in der Lösung befinden. DNA von nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen wird nicht detektiert. Ein Zentrifugationsschritt konzentriert die ggf. vorhandenen Zellen der Mikroorganismen und entfernt Rückstände der Anreicherungskultur. Während des Lysozymsschritts werden die Zellwände hydrolysiert, so dass die RNA leichter verfügbar ist.

2.) Hybridisierung

Ein Teil der suspendierten Probenlösung wird mit dem Sondenmix vermischt. In der nachfolgenden, exakt temperierten Hybridisierungsreaktion werden die Zellen lysiert und die markierten Sonden binden an die freigesetzte ribosomale RNA. Dieses markierte Reaktionsprodukt wird direkt auf dem Lateral-Flow Streifen detektiert.

3.) Detektion

Die Detektion wird mit einem immunochromatografischen Verfahren auf einem Lateral-Flow-System durchgeführt. Damit wird der Komplex aus RNA und hybridisierten Sonden nachgewiesen.

Der hybridisierte Komplex aus RNA und Sonden bindet an einen Antikörper, der auf Gold-Partikeln immobilisiert ist. Die Diffusion des Chromatographiepuffers transportiert den Komplex durch die Membran, die mit mehreren Linien von verschiedenen Fängermolekülen beschichtet ist. An der ersten Linie werden spezifisch die Partikel gebunden, die sowohl die markierte RNA des Zielorganismus als auch anhybridisierte Sonden enthalten. Durch die Bindung werden die Gold-Partikel aufkonzentriert und formen eine sichtbare rote Linie. Goldpartikel ohne gebundenes Produkt diffundieren weiter und binden an der zweiten Linie. Diese Linie dient als Kontrolle für den korrekten chromatografischen Ablauf und die Funktionsfähigkeit der Goldpartikel.

Trouble-Shooting

Problem	Ursache	Empfehlung
Kein Wachstum in der Anreicherungskultur	a) ungeeignete Wachstumstemperatur b) ungeeignetes Medium c) Inaktivatorlösung nicht funktionsfähig	a) Wachstumstemperatur überprüfen (z.B. Angaben DSMZ) b) Vollmedium (z.B. Caso) anstatt Selektivmedium verwenden c) andere Inaktivatorlösung verwenden oder neu ansetzen
Keine Laufkontrolle sichtbar (obere Kontroll-Linie)	a) Falscher oder nicht mehr funktionsfähiger Chromatographiepuffer b) Haltbarkeit der Teststreifen überschritten c) Falsche Lagerung der Teststreifen	a) Neue Chemikalien verwenden b) Neue Teststreifen verwenden c) Lagerung: verschlossen bei 2-8°C
Sämtliche Proben und Kontrollen zeigen ein positives Signal	a) Kontamination der Hybridisierungsreaktion b) Chromatographiepuffer mit positivem Hybridisierungsprodukt kontaminiert	a) Arbeitsplatz und sämtliche Pipetten dekontaminieren; Chemikalien überprüfen b) Frischen Chromatographiepuffer verwenden
Positivkontrolle zeigt ein negatives Signal	a) keinen Sondenmix zugegeben b) falsche Hybridisierungstemperatur c) Hemmung durch Produkt	a) Nachweis wiederholen, Reagenzien überprüfen b) Temperaturführung überprüfen c) Nachweisreaktion wiederholen, Inaktivatorlösung verwenden

Anlage

- Vorlage LFD Dokumentation
- Kurzprotokoll