



Mast Group Ltd.
Mast House, Derby Road,
Bootle, Merseyside, L20 1EA
United Kingdom
Tel: + 44 (0) 151 472 1444
Fax: + 44 (0) 151 944 1332
email: sales@mast-group.com
Web: www.mast-group.com



Mast Diagnostica GmbH
Feldstrasse 20
DE-23858 Reinfeld
Germany
Tel: + 49 (0) 4533 2007 0
Fax: + 49 (0) 4533 2007 68
email: mast@mast-diagnostica.de
Web: www.mast-group.com

Mast Diagnostic
12 rue Jean-Jacques Mention
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1
France
Tél: + 33 (0) 3 22 80 80 67
Fax: + 33 (0) 3 22 80 99 22
email: info@mast-diagnostic.fr
Web: www.mast-group.com



MAST ISOPLEX® *E. coli* O157-Kit

DNA/LYO4 20 Tests

Zur Verwendung mit Real-Time Thermocyclern, die FAM und TAMRA detektieren.

Verwendungszweck

Das MAST ISOPLEX® *E. coli* O157-Kit ist ein Amplifikationskit zur Typisierung des O157 *Escherichia coli* aus humanen Stuhlproben mittels Loop-initiiertem isothermalem Amplifikationsreaktion (LAMP). Hierbei wird die MAST ISOPLEX® Sonden-Technologie verwendet. Dieses Kit enthält Reagenzien zur Detektion der Perosaminsynthetase (RfbE), die von *E. coli* O157 exprimiert wird. *E. coli* O157-Gene können gleichzeitig in einem Zweifach-Assay mit entsprechender Inhibitionskontroll-DNA (IC DNA) detektiert werden.

Kit-Komponenten

1. *E. coli* O157 Pellets (PEL1): 2 Pellets, Röhren mit violetter Verschluss
2. *E. coli* O157 Primer- und Sonden-Mischung mit Inhibitionskontroll-DNA (PP1): 2 Röhren, Röhren mit blauem Verschluss
3. Positiv-Kontroll-DNA (O157): Röhren mit braunem Verschluss
4. Rekonstitutionspuffer (RB): 1 Röhren, Röhren mit gelbem Verschluss
5. Wasser (WTR): 1 Röhren, Röhren mit schwarzem Verschluss

Lagerung und Haltbarkeit

Ungeöffnetes Kit bei 2°C bis 8°C bis zu dem auf dem Verpackungsetikett angegebenen Verfallsdatum im Dunkeln lagern. Nach der Rekonstitution sollten alle Reagenzien aliquotiert und bei Minus 20°C bis zu dem auf dem Röhren angegebenen Verfallsdatum gelagert werden. Alle anderen Komponenten bei 2°C bis 8°C im Dunkeln lagern.

Vorsichtsmaßnahmen

Um eine Kontamination der Reagenzien im Kit und der Proben zu verhindern, sind entsprechende Vorkehrungen zu treffen. Das Kit ist nur von geschultem Laborpersonal zu verwenden. Dabei sollen Reaktionsgefäße nach Zugabe von Reagenzien stets geschlossen gehalten und nach Gebrauch gemäß den örtlichen Gesundheits- und Sicherheitsrichtlinien verschlossen entsorgt werden. Niemals ein Probengefäß nach der Amplifikation öffnen, um jegliche Kontamination mit dem amplifizierten Produkt zu vermeiden. Reaktionsgefäße nicht vortexen. Es sollte sichergestellt sein, dass Reaktionsgefäße vor dem Gebrauch keine Kratzer und Risse aufweisen.

Zusätzlich benötigte Materialien

1. DNA-Extrakte aus humaner Stuhlprobe sind vom Anwender bereitzustellen.
2. Um die bestmögliche Assaysensitivität zu gewährleisten, werden DNA-Extrakte aus Übernachtskulturen empfohlen.
3. DNA-Proben gemäß Standard-Laborverfahren isolieren.

4. Standardmäßig DNase-freies Zubehör wie Reaktionsröhrchen, Pipetten und Pipettenspitzen verwenden.
5. Verwendung eines Real-Time Thermocyclers, z.B. ABI 7500 FAST REAL-TIME PCR-System, der in der Lage ist, eine isothermale Inkubation von Reaktionsgefäßen bei der gewünschten Temperatur durchzuführen. Das System sollte über einen Fluoreszenz-Detektor mit FAM- und TAMRA-Detektionskanälen zur Erkennung von Amplifikationsprodukten verfügen.

Vorbereitung der Reagenzien

Rekonstitution der lyophilisierten Komponenten:
Das Röhren kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren, um sicherzustellen, dass sich das lyophilisierte Pellet am Boden des Röhrens befindet.

Rekonstitution der Reagenzien durchführen wie in Tabelle 1 beschrieben.

Den Inhalt durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mischen.

Jedes Reagenzienröhren ist für 10 Reaktionen ausreichend.

Tabelle 1: Rekonstitution der lyophilisierten Komponenten

Komponente	Diluent	Volumen
PEL2	RB	20 µL
PP2	H ₂ O	10 µL
O157 DNA	H ₂ O	20 µL

O157 Assay-Setup

Für die O157 Assays die PEL2 Pellets verwenden. Jedes rekonstituierte PEL2 kann für 10 Reaktionen verwendet werden (10 µL pro Ansatz). Reaktion durchführen wie in Tabelle 2 beschrieben.

Tabelle 2: O157 Assay-Setup

O157 Assay-Setup	Pro Probe
PEL2 in RB rekonstituiert	2 µL
Rekonstituiertes PP2	1 µL
DNA-Probe oder O157 DNA (Positivkontrolle)	1-7 µL DNA-Probe oder 1 µL der O157 PC DNA
WTR	0-6 µL
Gesamtvolumen	10 µL

Für eine Negativkontrolle eine No-Template-Kontrolle (NTC) ansetzen, in der die DNA-Probe durch Wasser (WTR) ersetzt wird.

Setup-Information für den verwendeten Real-Time Thermocycler

Farbstoffauswahl:

TAMRA zur Detektion der IC

FAM zur Detektion von VT2

Temperatur: 63 °C

Probenvolumen: 10 µL

ROX (falls vorhanden): nicht ausgewählt

Assay-Laufzeit: 40 Minuten

Datenanalyse:

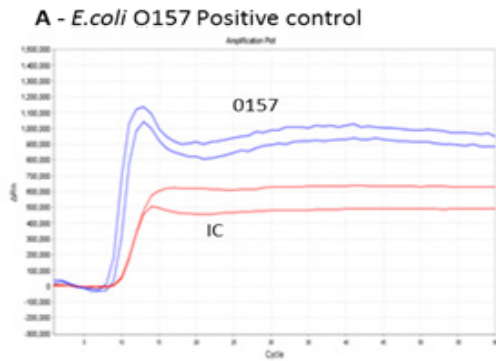
Baseline: 3 bis 5 Zyklen
 Grenzwert-Setup: entsteht durch die Negativkontrolle oberhalb des Plots.

Interpretation der Ergebnisse

Thermocycler-Ergebnisse: Ein positives Ergebnis wird durch das Vorhandensein einer Amplifikationskurve und ein negatives Ergebnis durch Fluoreszenz ohne Amplifikation innerhalb der Reaktionszeit angezeigt: siehe folgende Abbildung (ABI 7500 FAST REAL-TIME PCR-System).

Abbildung 1: Beispiel eines Amplifikationsplots für einen Zweifach-Assay

A – *E.coli* O157 Positivkontrolle



B – No-Template-Kontrolle

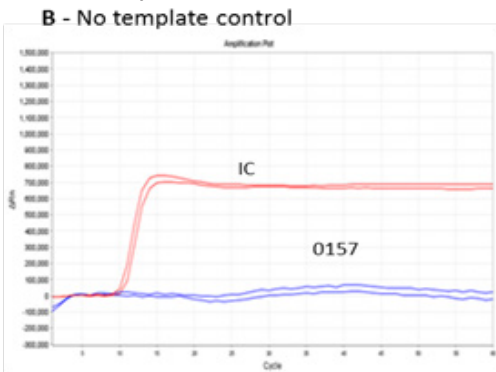


Tabelle 3: Kriterien zur korrekten Interpretation des LAMP Multiplex-Assays mit einer Inhibitionskontrolle (IC)

Kontrollen	Targetgen (O157 FAM)	IC-TAMRA	Interpretation
Negativkontrolle	-	+	valide
Positivkontrolle	+	+	valide
Probe	-	+	negativ für das Targetgen
Probe	-	-	nicht valide
Probe	+	+/- *	positiv für das Targetgen

* Unter Umständen kann die IC-TAMRA nicht amplifiziert werden, wenn die Menge der Target-DNA so groß ist, dass sie die der IC-TAMRA-Primer kompetitiv überlagert.

Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, pro Testlauf eine Qualitätskontrolle des MAST ISOPLEX® *E. coli* O157-Kits mit dem LAMP-Pellet (PEL2), der Positiv-Kontroll-DNA (O157), der Primer- und Sonden-Mischung mit Inhibitionskontroll-DNA (PP1), dem Pellet-Rekonstitutionspuffer (RB) und dem im Kit enthaltenen Wasser (WTR) durchzuführen. Diese Tests stellen sicher, dass die Reagenzien die angegebenen Assay-Eigenschaften erbringen und keine Kontamination der Kit-Reagenzien vorliegt. Führen Kontrollreaktionen zu falschen Ergebnissen, sollte vor der Anwendung geprüft werden, ob Anzeichen auf Verfall oder Kontamination der Kit-Reagenzien vorliegen und ein Wiederholungsansatz muss durchgeführt werden. Generiert der Wiederholungsansatz erneut falsche Ergebnisse, kontaktieren Sie bitte den technischen Support von MAST®.

Limitierungen

Diese Produkte werden für die Amplifikation von DNA-Proben unter Verwendung von Standard-DNA-Extraktionsmethoden verwendet. Die Qualitätskontrolle zeigt, ob Kit-Reagenzien und Kontrollen funktionsfähig und kontaminationsfrei sind. Sie kann aber keine möglichen Probleme erfassen, die bei der DNA-Extraktion auftreten können. DNA-Extraktionen liegen in der alleinigen Verantwortung des Endverbrauchers. Die mit diesem Kit erzielten Ergebnisse müssen mit anderen klinischen Tests zur Diagnose einer Infektion abgeglichen werden.

Spezifität/Sensitivität/Nachweisgrenze (LOD)

Die Daten basieren auf DNA-Extrakten einer vermutlich *E. coli* O157-positiven Stuhlprobe und einer negativen Kultur (n=23).

Sensitivität – 100%
 Spezifität – 100%
 LOD (Anzahl der Genkopien) O157: 1166