



RiboFlow[®] *E. coli* Detection Kit

Handbuch, Version 1, August 2016

Artikelnummer 51-422113

24 Tests

Lagerung bei: +2 bis +25°C

SY-LAB Geräte GmbH
Tullnerbachstrasse 61-65, A-3011 Neupurkersdorf, AUSTRIA
Tel. +43-2231-62252-0
Fax: +43-2231-62193
E-mail: sales@sylab.com
Technischer Support: supportbio@sylab.com
Internet: www.sylab.com

RiboFlow[®] *E. coli* Detection Kit

Inhaltsverzeichnis

1. Allgemeine Informationen.....	4
1.1 Kitkomponenten und Lagerungsbedingungen	4
1.2 Sonstige benötigte Materialien und Geräte.....	4
1.3 Verwendung / Anwendungsbereich	5
1.4 Sicherheitsinformation	5
1.5 Garantie und Garantiebeschränkung.....	6
1.6 Qualitätskontrolle	6
1.7 Leistungsmerkmale.....	6
1.8 Technischer Service	6
1.9 Einführung.....	7
1.10 Testprinzip.....	7
2. Protokoll.....	8
2.1 Kultivierung.....	8
2.1.1 BacTrac Screening	8
2.1.1.1 Kosmetik-Proben	8
2.1.1.2 Andere Proben.....	9
2.1.2 Direktanreicherung, Anreicherung für die Durchfluss- Cytometrie und Anreicherung für ATP-Nachweissysteme (für Kosmetik-Proben)	10
2.1.3 Einzelkolonien von Agarplatten	11
2.2 RiboFlow [®] <i>E. coli</i> Lateral Flow Test.....	12
2.2.1 Standardprotokoll für Flüssigkulturen.....	12
2.2.2 Standardprotokoll für die direkte Testung von Einzelkolonien .	15
2.3 Auswertung.....	17
2.4 Wichtige allgemeine Hinweise	20
3. Bestellinformation	21
4. Kurzprotokolle	22
4.1 Kurzprotokoll für Flüssigkulturen	22
4.2 Kurzprotokoll für die direkte Testung von Einzelkolonien	23

1. Allgemeine Informationen

1.1 Kitkomponenten und Lagerungsbedingungen

Solution A, 2 ml

Solution B, 1 ml

Solution C, 2 ml

RiboFlow[®] *E. coli* Lateral Flow Assay devices, 24 Stk. (4 × 6)

Reaktionsgefäße, 30 Stk.

Handbuch

Alle Kitkomponenten können bei +2 bis +25°C gelagert werden.

1.2 Sonstige benötigte Materialien und Geräte

Benötigt:

- Mikropipetten
- Sterile Pipettenspitzen
- Inkubator für Anreicherungskulturen
- Geeignete Verdünnungslösungen und Anreicherungsmedien zur Untersuchung von Kosmetikproben bzw. geeignete Medien zur Untersuchung von anderen Proben auf *E. coli* (siehe Abschnitt 2)
- Mini-Zentrifuge (Zentrifugalkraft mind. 2000 × g), SY-LAB Geräte GmbH, Artikelnummer 51-410000
- Mini-Inkubator IL10 (SY-LAB Geräte GmbH, Artikelnummer 51-410100 oder VWR international, Art. Nr. 390-0384)
- RiboFlow[®]-Manipulationsplatte (SY-LAB Geräte GmbH, Artikelnummer 51-410110)

Optional / Empfohlen:

- BacTrac Impedanzanalysator und entsprechende Medien und Materialien zum Nachweis von *E. coli* (weitere Informationen bei SY-LAB Geräte GmbH)
- Nicht-selektives Medium und ev. zusätzliche sterile Reaktionsgefäße (zur Subkultivierung älterer Kulturen / Einzelkolonien, falls adäquat)

1.3 Verwendung / Anwendungsbereich

Der RiboFlow[®] *E. coli* Detection Kit kann zur Detektion von *Escherichia coli* im Rahmen einer Untersuchung von Kosmetikproben gemäß ISO 17516 bzw. zur Detektion von *E. coli* in anderen Proben aus folgenden Ausgangsmaterialien verwendet werden

- Flüssigkulturen in Anreicherungsmedien
- reaktive Proben aus der Impedanzanalyse
- reaktive Proben aus der Durchfluss-Cytometrie oder ATP-Messung
- Subkulturen von Anreicherungen oder von Einzelkolonien
- Einzelkolonien von Agarplatten (siehe 2.1.3)

Dieser Testkit ist nicht für klinische Anwendungen zugelassen. Während der Testdurchführung sollten entsprechende Sicherheitsvorkehrungen für den Umgang mit Kitkomponenten getroffen werden (siehe Kapitel 1.4 „Sicherheitsinformation“).

1.4 Sicherheitsinformation

Bitte beachten Sie beim Umgang mit RiboFlow[®] Kitkomponenten die entsprechenden Sicherheitsdatenblätter. Diese sind für registrierte Kunden als Download von unserer Website (www.sylab.com) erhältlich (Mikrobiologie, Service & Downloads / Molekulare Mikrobiologie). Beachten Sie die allgemein üblichen Sicherheitsmaßnahmen im Umgang mit Chemikalien. Lagern Sie Kitkomponenten nie zusammen mit Nahrungsmitteln. Tragen Sie beim Arbeiten mit Chemikalien immer Handschuhe, Schutzbrille und entsprechende Arbeitskleidung.

Achtung: Befolgen Sie Ihre nationalen Sicherheitsvorschriften für den Umgang mit Mikroorganismen und treffen Sie entsprechende Vorkehrungen, um Infektionen zu verhindern. Vernichten Sie kontaminiertes Material durch Desinfektion bzw. Autoklavieren.

1.5 Garantie und Garantiebeschränkung

SY-LAB Geräte GmbH garantiert die Tauglichkeit des Produkts für den vorgesehenen Zweck bis zum angegebenen Ablaufdatum wie in Kapitel 1.7 “Leistungsmerkmale” beschrieben. Der Käufer muss das Produkt auf seine Tauglichkeit für die jeweilige Anwendung prüfen und gegebenenfalls die Durchführungsbedingungen anpassen. SY-LAB Geräte GmbH übernimmt keinerlei Verantwortung für Konsequenzen oder Schäden welcher Art auch immer, die sich durch den Gebrauch des Produkts ergeben. Sollte das Produkt aus anderen Gründen als falschem Gebrauch oder falscher Lagerung nicht den Leistungsmerkmalen entsprechen, wird SY-LAB es ersetzen oder den Kaufpreis rückerstatten, nachdem dies schriftlich vereinbart wurde. Wir behalten uns das Recht vor, das Produkt jederzeit zu verändern, um es zu verbessern. Sollten technische Probleme auftreten, zögern Sie bitte nicht, uns zu kontaktieren, damit wir Ihnen rasch und unkompliziert helfen können.

1.6 Qualitätskontrolle

Jede Charge des Produkts wird mittels Standardprotokollen auf ihre Qualität und Funktion überprüft. Qualitätskontrollzertifikate sind für registrierte Kunden als Download von unserer Website (www.sylab.com) erhältlich (Mikrobiologie, Service & Downloads / Molekulare Mikrobiologie).

1.7 Leistungsmerkmale

Dieser Testkit wurde entwickelt, um die Detektion von *E. coli* aus Anreicherungskulturen und/oder die Bestätigung von verdächtigen Einzelkolonien von Agarplatten (siehe 2.1.3) zu ermöglichen.

Für jede Charge des RiboFlow® *E. coli* Detection Kits wird ein analytisches Detektionslimit von $3,6 \times 10^{10}$ Molekülen der Ziel-Nukleinsäure verifiziert.

1.8 Technischer Service

Für technische Beratung wenden Sie sich bitte an unseren technischen Service (E-mail: supportbio@sylab.com, Tel.: +43-2231-62252-0, Fax: +43-2231-62193).

Als unser Kunde sind Sie für uns eine wertvolle Informationsquelle, was Ihre spezielle Anwendung und Ihre Anforderungen an unser Produkt betrifft. Ihre Informationen und Ihre Kritik sind hilfreich für uns, da wir ständig an der Verbesserung unserer Produkte arbeiten. Daher bitten wir Sie, uns zu kontaktieren, wenn Sie Vorschläge haben, die unsere Produkte betreffen.

1.9 Einführung

Der Nachweis von *E. coli* erfolgt in der Regel mittels klassischer mikrobiologischer und biochemischer Methoden, die durch einen hohen Zeitaufwand und hohe Kosten charakterisiert sind. Schnellere, verlässliche molekularbiologische Methoden sind daher immer mehr gefragt. Eine schnelle molekularbiologische Methode reduziert Zeit und Kosten und ist darüber hinaus im Vergleich mit mikrobiologischen/biochemischen Methoden oft spezifischer. Der RiboFlow® *E. coli* Detection Kit wurde entwickelt, um einen hochspezifischen und sehr einfachen Nachweis von *E. coli* innerhalb weniger Minuten mit geringem Arbeits- und Apparateaufwand zu ermöglichen.

1.10 Testprinzip

Eine für *E. coli* spezifische ribosomale RNA-Sequenz wird mittels eines proprietären Nukleinsäurehybridisierungs-Protokolls in einem einfachen Lateral Flow Assay Format innerhalb von 30 Minuten aus einem groben Zell-Lysat direkt aus einer angereicherten Probe oder aus einer Einzelkolonie nachgewiesen. Eine aufwändige Nukleinsäureaufreinigung oder eine enzymatische Amplifizierung der Zielsequenz sind nicht nötig.

2. Protokoll

Hinweis: Dieser Test ist für die Analyse von angereicherten Proben (konventionelle Anreicherungskulturen, Anreicherungen aus der Impedanzanalytik sowie Anreicherungen für die Durchflusszytometrie oder für ATP-Nachweissysteme) vorgesehen. Er kann auch zur Bestätigung von verdächtigen Einzelkolonien von den unter 2.1.3 angeführten Agarplatten verwendet werden.

2.1 Kultivierung

2.1.1 BacTrac Screening

2.1.1.1 Kosmetik-Proben

Hinweise: Für Informationen bezüglich des Umgangs mit spezifischen SY-LAB Medien und bezüglich entsprechender BacTrac-Protokolle folgen Sie bitte den jeweiligen SY-LAB Medienzubereitungsvorschriften und BacTrac Applikationsnotizen für registrierte Kunden auf unserer Website (www.sylab.com, Mikrobiologie, Service & Downloads / Elektrische Mikrobiologie bzw. Molekulare Mikrobiologie).

Folgende Voranreicherungsmedien sind für die BacTrac Analyse gemäß dem entsprechenden SY-LAB BacTrac Applikationsprotokoll geeignet:

- Caseinpepton-Lecithin-Polysorbat-Bouillon Basis (z. B. Merck, Art. Nr. 1.11723.0500) mit 40 ml / L Polysorbat 80 (Tween[®] 80).
- TSB-TLHC Bouillon (z. B. Merck, Art. Nr. 1464920010)
- Eugon LT 100 Broth (z. B. Scharlau Microbiology, Art. Nr. 02-654)
- Modified Lethen Broth (z. B. Merck, Art. Nr. 1.10405.0500)

Durchführung:

1. Erforderliche Menge an Voranreicherungsmedium laut Vorschrift auf der jeweiligen Verpackung herstellen und sterilisieren/autoklavieren.
TSB-TLHC Bouillon ist gebrauchsfertig abgefüllt in Flaschen zu 90 ml erhältlich.

Hinweis: Medien, die Polysorbat / Lecithin enthalten, sollten noch warm aus dem Autoklaven entnommen werden (**Vorsicht:** Verletzungsgefahr beim Umgang mit heißen Lösungen!) und **unter Rühren** abgekühlt werden, damit das Polysorbat / Lecithin homogen gelöst bleibt (**Achtung:** Einmal erkaltet lässt sich das Polysorbat nicht mehr lösen!).

2. 1 g Probe in 90-100 ml Voranreicherungsmedium homogenisieren und 24 ± 2 Std. bei $+30 \pm 1^\circ\text{C}$ inkubieren.
3. Vorangereicherte Probe kurz homogenisieren und 1,0 ml davon in eine BacTrac Fertigmesszelle mit 9,0 ml BiMedia 001C überimpfen.
4. BacTrac Analyse mit den angegebenen Messparametern durchführen.

Messparameter: Temperatur: $+30^\circ\text{C}$
Messdauer: 24 Std.
Aufwärmzeit: 1 Std.
Messintervall: 10 Minuten
Bewertungstyp: X
Schwellenwert M: 3%
Schwellenwert E: 10%

5. Wenn die BacTrac Analyse beendet ist, Standardprotokoll für RiboFlow[®] *E. coli* wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben durchführen (bitte beachten Sie die wichtigen Hinweise in Abschnitt 2.2 bzw. 2.4). Nur BacTrac-reaktive, also positive Proben werden weiter untersucht.

Hinweis: Dieser Test sollte nicht unmittelbar nach Überschreiten der Detektionsschwelle im BacTrac durchgeführt werden, sondern erst, nachdem eine gut definierte Wachstumskurve sichtbar ist.

2.1.1.2 Andere Proben

Hinweise: Für Informationen bezüglich des Umgangs mit spezifischen SY-LAB Medien und bezüglich entsprechender BacTrac-Protokolle folgen Sie bitte den jeweiligen SY-LAB Medienzubereitungsvorschriften und BacTrac Applikationsnotizen für registrierte Kunden auf unserer Website (www.sylab.com, Mikrobiologie, Service & Downloads / Elektrische Mikrobiologie bzw. Molekulare Mikrobiologie).

Wenn die BacTrac Analyse beendet ist, Standardprotokoll für RiboFlow® *E. coli* wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben durchführen (bitte beachten Sie die wichtigen Hinweise in Abschnitt 2.2 bzw. 2.4). Nur BacTrac-reaktive, also positive Proben werden weiter untersucht.

Hinweis: *Dieser Test sollte nicht unmittelbar nach Überschreiten der Detektionsschwelle im BacTrac durchgeführt werden, sondern erst, nachdem eine gut definierte Wachstumskurve sichtbar ist.*

2.1.2 Direktanreicherung, Anreicherung für die Durchfluss-Cytometrie und Anreicherung für ATP-Nachweissysteme (für Kosmetik-Proben)

Hinweis: Als Anreicherungsmedien für die Direktanreicherung können die in 2.1.1 beschriebene Caseinpepton – Lecithin – Polysorbat - Bouillon oder Anreicherungsmedien entsprechend ISO 21249 bzw. ISO 16212 verwendet werden. Für die Anreicherung für die Durchflusscytometrie bzw. ATP-Messung werden die entsprechenden dafür empfohlenen Spezialanreicherungsmedien verwendet.

Durchführung:

1. Erforderliche Menge an geeignetem Anreicherungsmedium laut jeweiliger Vorschrift herstellen.
2. 1 g Probe in 90-100 ml Anreicherungsmedium homogenisieren und je nach Methode 22 - 48 Std. bei $+30 \pm 1^\circ\text{C}$ inkubieren.
3. Danach Standardprotokoll für RiboFlow® *E. coli* wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben durchführen (bitte beachten Sie die wichtigen Hinweise in Abschnitt 2.2 und 2.4). Bei Verwendung von Durchfluss-Cytometern bzw. ATP-Messung nur reaktive (positiv bewertete) Proben mittels RiboFlow® bestätigen.

2.1.3 Einzelkolonien von Agarplatten

Hinweise: Prinzipiell empfehlen wir eine kurze Subkultivierung von verdächtigen Einzelkolonien, da die rRNA-Synthese in einer wachsenden Kultur aktiver ist als in der stationären Phase. Einzelkolonien mit einem Durchmesser > 2 mm können aber auch direkt von der Agarplatte abgenommen und mit dem RiboFlow® Standardprotokoll für die direkte Testung von Einzelkolonien wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben analysiert werden, vorausgesetzt die Platte wurde nicht länger als die vorgeschriebene Zeit inkubiert oder gelagert. Erfolgreich getestet wurden Nähragar, Columbia Agar und Sorbitol McConkey Agar.

Einzelkolonien von TBX, Gassner, Eosin Methylenblau, McConkey Nr. 3, chromogenem Coliform, Brilliance™ E. coli/coliform, Endo-Agar, Tergitol 7-Lactose-TTC Agar, Plate Count Agar und TSA konnten in Einzelfällen nicht erfolgreich bestätigt werden, daher wird bei Verwendung dieser Medien eine Subkultivierung empfohlen.

Falls die Platte älter und/oder eine zu testende Kolonie zu klein (< 2 mm Durchmesser) ist, ist ebenfalls eine Subkultivierung in Flüssigmedium nötig. Ein solcher Kultivierungsschritt ermöglicht ggf. auch die Isolierung des Bakteriums, indem aus der Flüssigkultur auf eine neue Platte ausgestrichen wird, bevor die Bakterien für die Analyse abzentrifugiert werden. Wird eine Kolonie von der Platte direkt abgenommen und getestet, steht sie für eine Isolierung nicht mehr zur Verfügung.

Durchführung:

1. Bakterien auf (selektive) Agarplatten ausstreichen und Platten entsprechend der verwendeten Methode inkubieren.
2. Subkultivierung in einem nicht-selektiven Medium wie hier in Schritt 3 beschrieben durchführen, oder 1 - 5 große Kolonien (> 2 mm) gleich nach Beendigung der vorgeschriebenen Bebrütungszeit direkt von der Platte wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben analysieren (bitte beachten Sie die wichtigen Hinweise oben sowie in Abschnitt 2.2 und 2.4).
3. Subkultivierung: 1 - 5 morphologisch identische verdächtige Einzelkolonien mittels steriler Impföse von der Platte abnehmen, in ein steriles Reaktionsgefäß mit 0,5 ml eines nicht-selektiven Mediums (z. B. LB, BHI) transferieren und 3 ± 1 Std. bei $+36 \pm 1^\circ\text{C}$ inkubieren.

4. RiboFlow[®] *E. coli* Standardprotokoll gemäß Abschnitt 2.2.1 durchführen (bitte beachten Sie die wichtigen Hinweise in den Abschnitten 2.2 und 2.4).

2.2 RiboFlow[®] *E. coli* Lateral Flow Test

Achtung: Die Maßnahmen zur Einhaltung der in diesem Protokoll angegebenen Inkubations- / Reaktionsbedingungen müssen befolgt werden, ansonsten können Ergebnisse verfälscht werden. Dazu gehören die Verwendung eines IL-10 Mini-Inkubators, der auf +48°C eingestellt wurde, die Verwendung einer vorgewärmten RiboFlow[®] - Manipulationsplatte sowie das Vorwärmen von RiboFlow[®] Lateral Flow devices (Testkassetten) und Solution C. Manipulationen zügig und möglichst innerhalb des Mini-Inkubators bei geöffneter Tür durchführen bzw. Manipulationen außerhalb des Inkubators (nur mit Manipulationsplatte) auf ein Minimum beschränken. Die Testauswertung muss unmittelbar nach Ablauf der angegebenen Inkubationszeit erfolgen, bevor die Lateral Flow Testkassetten auf Umgebungstemperatur abkühlen können.

2.2.1 Standardprotokoll für Flüssigkulturen

Hinweis: Dieses Protokoll ist für Anreicherungen, reaktive BacTrac-Messzellen und Flüssigkulturen aus nicht-selektiven Medien (z. B. Subkulturen von älteren / gelagerten Anreicherungen und von Einzelkolonien) geeignet.

Durchführung:

1. Temperatur des IL-10 Mini-Inkubators auf +48°C einstellen und Inkubator aufheizen lassen, bis stabil +48°C angezeigt werden.
2. Die RiboFlow[®]-Manipulationsplatte mindestens eine Stunde vor Testdurchführung im auf +48°C aufgeheizten IL-10 Mini-Inkubator vorwärmen.

Hinweis: Die Manipulationsplatte kann auch permanent anstelle eines Einlegebodens im (eingeschalteten) IL-10 Mini-Inkubator verbleiben. In diesem Fall kann man sofort mit Schritt 3 beginnen. War der Inkubator ausgeschaltet, so muss nach dem Einschalten bei stabiler Anzeige von +48°C noch eine Stunde

mit der Testdurchführung gewartet werden, um sicherzustellen, dass die Platte ebenfalls die erforderliche Temperatur erreicht.

3. Solution C und die benötigte Anzahl RiboFlow[®] Lateral Flow Assay devices (Testkassetten) mindestens 10 Minuten vor Testdurchführung im IL-10 Mini-Inkubator auf +48°C vorwärmen. Dafür Kassetten in die vorgewärmte RiboFlow[®]-Manipulationsplatte im Inkubator so einschieben, dass Sample Ports nicht von der Plexiglasabdeckung bedeckt sind (Abbildung 1).
Restliche Kitkomponenten/Lösungen vor Verwendung auf Umgebungstemperatur (+18 bis +30°C) bringen.
4. Nach der Kultivierung Flüssigkulturen vor der Probennahme sanft schütteln (ohne zu verschütten) oder durch Auf- und Abpipettieren homogenisieren. Im Falle von 0,5 ml Subkulturen mit dem Zentrifugationsschritt (Schritt 6) beginnen.
5. 0,5 ml der homogenisierten Probe in ein Reaktionsgefäß transferieren. Impedanzanalyse: Im Falle einer Doppelbestimmung jeweils 0,25 ml aus den jeweils zusammengehörenden BacTrac-reaktiven Messzellen in einem Reaktionsgefäß vereinigen.
6. Bakterien 5 Minuten lang bei mindestens 2000 × g abzentrifugieren.
7. Überstand vorsichtig abheben und verwerfen, ohne den Niederschlag mit den Bakterien zu verlieren.
8. Bakterienpellet in 50 µl Solution A gründlich aber vorsichtig mittels Auf- und Abpipettieren resuspendieren, Schäumen vermeiden.
9. Zur Probe 25 µl Solution B zugeben und gut mischen (ev. Vortex). Das Bakterienpellet muss nun vollständig resuspendiert sein.

Hinweis: Falls ein Vortex vorhanden ist und mehrere Bakterienpellets gleichzeitig aufgearbeitet werden müssen, ist es ev. einfacher und zeitsparender, zu jeder Probe jeweils 75 µl einer vorbereiteten 2+1 Mischung aus Solution A + Solution B zuzugeben und danach die Bakterienpellets zur Resuspendierung mittels Vortex gründlich zu homogenisieren.

10. Homogenat bei Umgebungstemperatur (+18 bis +30°C) 6 ± 1 Minuten inkubieren.

11. Danach 60 µl der vorgewärmten Solution C zur Probe geben und mischen (ev. Vortex). Sofort weiter mit Schritt 12.
12. Gesamte Probe (~135 µl) rasch auf den Sample Port der vorgewärmten RiboFlow[®] Lateral Flow Testkassette auf der Manipulationsplatte auftragen. Probe einziehen lassen.
Testkassetten / Manipulationsplatte nach dem Auftragen der Proben nur vorsichtig bewegen, um ein Verschütten zu vermeiden.

Hinweise: Führen Sie alle nötigen Manipulationen in der Nähe des IL-10 Mini-Inkubators durch und vermeiden Sie ein Entfernen der RiboFlow[®]-Manipulationsplatte aus dem Inkubator vor/bei Testdurchführung. Um ein zu starkes Auskühlen der Platte bzw. der Lateral Flow Tests vor dem Lauf zu verhindern, kann das Auftragen der Proben praktischerweise zügig bei geöffneter Inkubatortür und leicht herausgeschobener RiboFlow[®]-Manipulationsplatte erfolgen.

Die Migration der Probe im RiboFlow[®] device kann bequem durch das Glasfenster der geschlossenen Inkubatortüre beobachtet werden. Wenn der Lauf nicht binnen 2 Minuten startet (dies kann manchmal bei extrem viskosen Proben vorkommen), kann es hilfreich sein, mit einer Mikropipettenspitze die Oberfläche des Pads im Sample Port leicht anzukratzen.

13. Test(s) auf der Manipulationsplatte 15 ± 1 Min. im geschlossenen IL-10 Mini-Inkubator inkubieren, dann sofort auswerten (siehe Abschnitt 2.3).

2.2.2 Standardprotokoll für die direkte Testung von Einzelkolonien

Hinweise: Dieses Protokoll ist, unter Berücksichtigung der Hinweise unter Punkt 2.1.3, für die direkte Analyse von Einzelkolonien > 2 mm Durchmesser von Platten ohne zusätzliche Subkultivierung in Flüssigmedium geeignet. Beachten Sie bei der Durchführung des Tests bitte die wichtigen Hinweise unter 2.2 und 2.4.

Durchführung:

1. Temperatur des IL-10 Mini-Inkubators auf +48°C einstellen und Inkubator aufheizen lassen, bis stabil +48°C angezeigt werden.
2. Die RiboFlow[®]-Manipulationsplatte mindestens eine Stunde vor Testdurchführung im auf +48°C aufgeheizten IL-10 Mini-Inkubator vorwärmen.

Hinweis: Die Manipulationsplatte kann auch permanent anstelle eines Einlegebodens im (eingeschalteten) IL-10 Mini-Inkubator verbleiben. In diesem Fall kann man sofort mit Schritt 3 beginnen. War der Inkubator ausgeschaltet, so muss nach dem Einschalten bei stabiler Anzeige von +48°C noch eine Stunde mit der Testdurchführung gewartet werden, um sicherzustellen, dass die Platte ebenfalls die erforderliche Temperatur erreicht.

3. Solution C und die benötigte Anzahl RiboFlow[®] Lateral Flow Assay devices (Testkassetten) mindestens 10 Minuten vor Testdurchführung im IL-10 Mini-Inkubator auf +48°C vorwärmen. Dafür Kassetten in die vorgewärmte RiboFlow[®]-Manipulationsplatte im Inkubator so einschieben, dass Sample Ports nicht von der Plexiglasabdeckung bedeckt sind (Abbildung 1).
Restliche Kitkomponenten/Lösungen vor Verwendung auf Umgebungstemperatur (+18 bis +30°C) bringen.
4. Eine Mischung aus 50 µl Solution A und 25 µl Solution B in einem leeren Reaktionsgefäß vorbereiten.
5. 1-5 typische Einzelkolonien mittels Impföse von der (Selektiv-)Agarplatte nehmen und gründlich in der in Punkt 4 vorbereiteten Mischung aus Solution A und Solution B resuspendieren.

6. Gut mischen (ev. Vortex) und Mischung bei Umgebungstemperatur (+18 bis +30°C) 6 ± 1 Minuten inkubieren.
7. Danach 60 µl der vorgewärmten Solution C zur Probe geben und mischen. Sofort weiter mit Schritt 8.
8. Die gesamte Probe (~135 µl) rasch auf den Sample Port einer vorgewärmten RiboFlow[®] Lateral Flow Testkassette auf der Manipulationsplatte auftragen. Probe einziehen lassen.
Testkassetten / Manipulationsplatte nach dem Auftragen der Probe nur vorsichtig bewegen, um ein Verschütten zu vermeiden.

Hinweise: *Führen Sie alle nötigen Manipulationen in der Nähe des IL-10 Mini-Inkubators durch und vermeiden Sie ein Entfernen der RiboFlow[®]-Manipulationsplatte aus dem Inkubator vor/bei Testdurchführung. Um ein zu starkes Auskühlen der Platte bzw. der Lateral Flow Tests vor dem Lauf zu verhindern, kann das Auftragen der Proben praktischerweise zügig bei geöffneter Inkubatortür und leicht herausgeschobener RiboFlow[®]-Manipulationsplatte erfolgen.*

Die Migration der Probe im RiboFlow[®] device kann bequem durch das Glasfenster der geschlossenen Inkubatortüre beobachtet werden. Wenn der Lauf nicht binnen 2 Minuten startet (dies kann manchmal bei extrem viskosen Proben vorkommen), kann es hilfreich sein, mit einer Mikropipettenspitze die Oberfläche des Pads im Sample Port leicht anzukratzen.

9. Test(s) auf der Manipulationsplatte 15 ± 1 Min. im geschlossenen IL-10 Mini-Inkubator inkubieren, dann sofort auswerten (siehe Abschnitt 2.3).

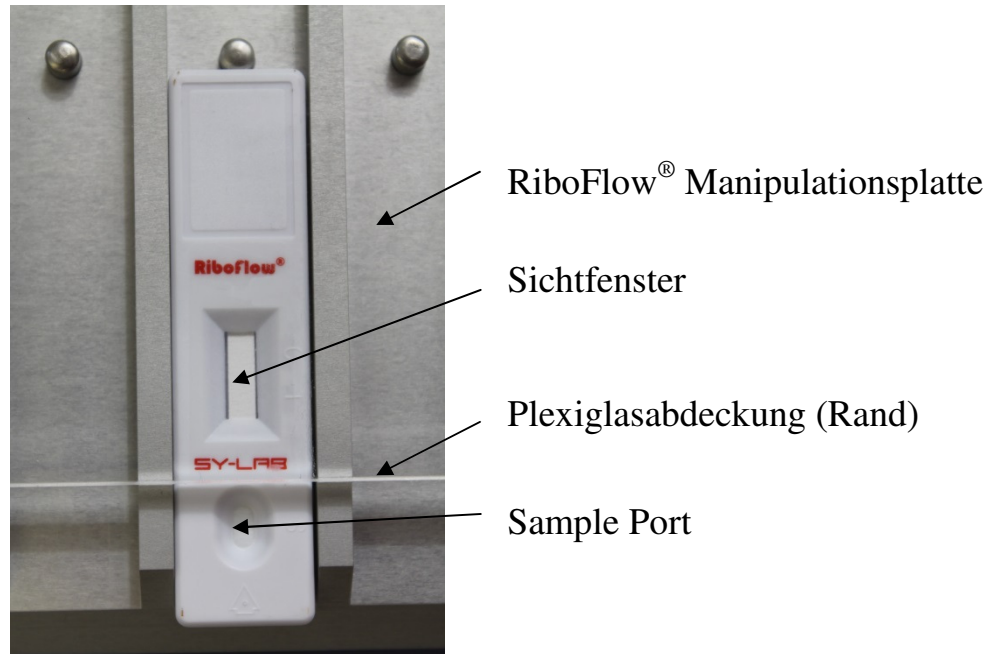


Abb. 1: RiboFlow[®] Lateral Flow Testkassette

2.3 Auswertung

Hinweis: RiboFlow[®] Lateral Flow Tests müssen nach 15 ± 1 Minuten Laufzeit sofort ausgewertet werden. Laufzeiten >16 Minuten könnten zu falsch positiven Ergebnissen führen, besonders bei zu niedrigen Temperaturen während des Laufs. Ebenso können einige Minuten nach Beendigung des Tests beim Abkühlen auf Umgebungstemperatur unspezifische Linien auftreten.

Auswertung: Abbildungen 2 - 4 zeigen Sichtfenster mit möglichen Resultaten von RiboFlow[®] *E. coli* Lateral Flow Tests.

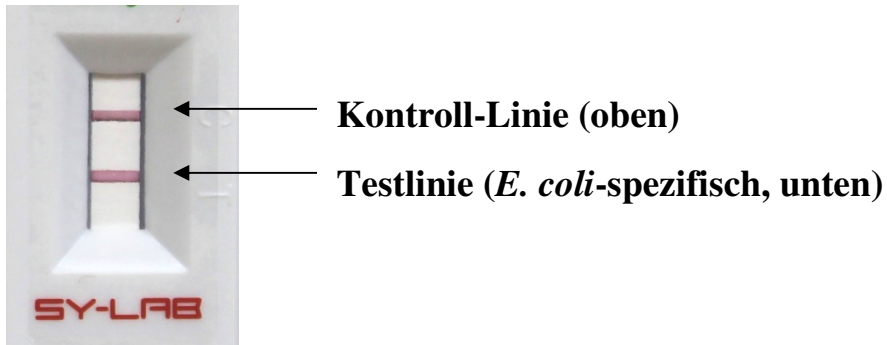


Abb. 2: Positives Resultat:

Wenn sowohl die Kontroll-Linie (oben) als auch die *E. coli*-spezifische Testlinie (unten) im Sichtfenster auftreten, ist das Resultat positiv für *E. coli*.

Die Kontroll-Linie (oben) kann in stark positiven Proben auch sehr schwach sichtbar sein.

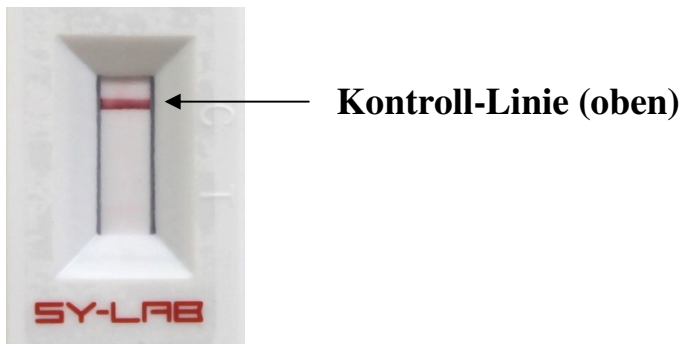


Abb. 3: Negatives Resultat:

Wenn nur die Kontroll-Linie (oben) sichtbar ist, konnte mit dem Test kein *E. coli* detektiert werden, und das Ergebnis ist negativ.



Abb. 4: Ungültiges Resultat: Wenn gar keine Linien auftreten, liegt ein Fehler in der Testdurchführung vor. Dieses Resultat ist ungültig, und der Test muss mit einer neuen RiboFlow[®] Testkassette von Punkt 2.2 weg wiederholt werden.

Für die dauerhafte Dokumentation von Ergebnissen (falls gewünscht) empfehlen wir die Fotografie mit einer digitalen Kamera sofort am Ende der Laufzeit. Da die Abdeckplatte der RiboFlow[®]-Manipulationsplatte transparent ist, können die devices zum Fotografieren praktischerweise in der Platte verbleiben, was ein Auskühlen nach dem Lauf und die mögliche Gefahr von nachträglich auftretenden falsch positiven Signalen verzögern kann.

2.4 Wichtige allgemeine Hinweise

- Dieser Test sollte immer mit frischen Bakterien am Ende der für die jeweilige Kultivierung vorgeschriebenen Inkubationszeit durchgeführt werden. Er sollte nicht für gelagerte Proben oder für Proben, die zu lange inkubiert wurden, verwendet werden, da rRNA bei zu langen Inkubationszeiten oder während der Lagerung eventuell auf nicht nachweisbare Konzentrationen abgebaut werden könnte. Der Rest einer angereicherten Probe kann jedoch einige Stunden lang gekühlt aufbewahrt werden, bis ein Ergebnis vorliegt, um nötigenfalls eine zweite Analyse am selben Tag zu ermöglichen.
Wenn eine längere Lagerung einer angereicherten Probe oder einer Platte unvermeidbar ist, sollte vor Testdurchführung eine Subkultur in einem nicht-selektiven Medium erfolgen, um die rRNA-Synthese anzukurbeln. Abzentrifugierte Bakterienpellets oder in Solution A resuspendierte Bakterien können als Niederschläge bzw. als Lysate bei -20°C für längere Zeit (einige Wochen) aufbewahrt werden.
- Angereicherte Kulturen vor der Probennahme immer durch leichtes Schütteln oder Schwenken bzw. Auf- und Abpipettieren homogenisieren, jedoch ohne zu verschütten.
- Der bakterielle Niederschlag muss spätestens nach dem Mischen mit Solution B vollständig und homogen resuspendiert sein!
- Zentrifugationen müssen mindestens 5 Minuten bei einer relativen Zentrifugalkraft (RCF) von mindestens $2000 \times g$ erfolgen, um zu gewährleisten, dass vorhandene Bakterien sedimentieren. Angaben zur RCF finden Sie in der Gebrauchsanweisung für Ihre Zentrifuge.
- Wenn mehrere Proben auf einmal analysiert werden, ist es ratsam, die Zeit zwischen den einzelnen Arbeitsschritten an einer Probe möglichst kurz zu halten (nicht mehr als 1 Minute), besonders nach dem Inkubationsschritt mit Solution B.
- Die Spezifität eines auf Nukleinsäure-Hybridisierung beruhenden Tests hängt stark von der Temperatur ab, besonders wenn kein Waschschrift durchgeführt wird, wie bei einem Lateral Flow Assay, und wenn nahe verwandte Arten unterschieden werden sollen. Dieser RiboFlow[®] - Kit wurde bei den in diesem Handbuch angegebenen Bedingungen und unter Verwendung des IL-10 Mini-Inkubators und der RiboFlow[®]-

Manipulationsplatte entwickelt und evaluiert. Bei Verwendung anderer, nicht speziell qualifizierter Inkubatoren können falsch positive Ergebnisse auftreten.

- Die Lateral Flow Tests müssen **unmittelbar** nach Ablauf der angegebenen Laufzeit **rasch** ausgewertet werden, denn durch das Abkühlen auf Umgebungstemperatur können negative Ergebnisse verfälscht werden.
- Arbeiten Sie immer mit sterilen Pipettenspitzen, um die sterilen Kitkomponenten nicht mikrobiell oder mit Nukleasen zu kontaminieren.
- RiboFlow[®] **Video Tutorials** als Anleitung sind von unserer Website abrufbar (www.sylab.com, Mikrobiologie, Service & Downloads / Molekulare Mikrobiologie)! Für weitere Fragen zu diesem Testkit steht Ihnen der SY-LAB Kundenservice gerne zur Verfügung.

3. Bestellinformation

- **RiboFlow[®] *E. coli* Detection Kit**, 24 Tests, Artikelnummer 51-422113
- **Mini-Zentrifuge M08**, Artikelnummer 51-410000
- **Mini-Inkubator IL10**, Artikelnummer 51-410100
- **RiboFlow[®]-Manipulationsplatte**, Artikelnummer 51-410110

4. Kurzprotokolle

4.1 Kurzprotokoll für Flüssigkulturen

<u>Schritt</u>	<u>Dauer</u>
1. Anreicherung ¹	je nach Methode
2. Lateral Flow Testkassetten (auf der vorgewärmten RiboFlow [®] -Manipulationsplatte) sowie Solution C mindestens 10 Min. im IL-10 Mini-Inkubator bei +48°C vorwärmen. Restliche Kitkomponenten auf Umgebungstemperatur (+18 bis +30°C) bringen.	
3. 0,5 ml angereicherte Probe ² abzentrifugieren	~5 Min.
4. Überstand entfernen und Bakterien in 50 µl Solution A resuspendieren	~1 Min.
5. Solution B (25 µl) zugeben, mischen und bei Umgebungstemperatur (+18 bis +30°C) inkubieren	6 ± 1 Min.
6. <u>Vorgewärmte Solution C</u> (60 µl) zugeben und mischen	~0,5 Min.
7. Gesamte Probe (~135 µl) auf <u>vorgewärmte</u> RiboFlow [®] Lateral Flow Testkassette auf der Manipulationsplatte im IL-10 Mini-Inkubator auftragen und Test <u>bei +48°C</u> inkubieren	15 ± 1 Min.
8. Sofortige Auswertung	

¹BacTrac Analyse, Direktanreicherung, Anreicherung für Durchfluss - Cytometrie oder für ATP-Messung (Kosmetik-Proben) bzw. BacTrac Analyse und andere Anreicherungen (andere Proben)

²Aus BacTrac Analyse, Durchfluss – Cytometrie und ATP-Messung werden nur reaktive (positive) Proben weiter untersucht. Aus anderen Anreicherungen wird jede einzelne Probe untersucht.

4.2 Kurzprotokoll für die direkte Testung von Einzelkolonien

<u>Schritt</u>	<u>Dauer</u>
1. Platte ausstreichen und inkubieren*	je nach Methode
2. Lateral Flow Testkassetten (auf der vorgewärmten RiboFlow [®] -Manipulationsplatte) sowie Solution C mindestens 10 Min. im IL-10 Mini-Inkubator bei +48°C vorwärmen. Restliche Kitkomponenten auf Umgebungstemperatur (+18 bis +30°C) bringen.	
3. Mischung aus 50 µl Solution A und 25 µl Solution B in einem Reaktionsgefäß vorbereiten	~1 Min.
4. 1 – 5 Einzelkolonien (Durchmesser > 2 mm) gründlich in der vorbereiteten Mischung resuspendieren	~0,5 Min.
5. 6 ± 1 Min. bei Umgebungstemperatur (+18 bis +30°C) inkubieren	6 ± 1 Min.
6. <u>Vorgewärmte Solution C</u> (60 µl) zugeben und mischen	~0,5 Min.
7. Gesamte Probe (~135 µl) auf <u>vorgewärmte</u> RiboFlow [®] Lateral Flow Testkassette auf der Manipulationsplatte im IL-10 Mini-Inkubator auftragen und Test <u>bei +48°C</u> inkubieren	15 ± 1 Min.
8. Sofortige Auswertung	

* Geeignete Platten für dieses Protokoll siehe Abschnitt 2.1.3

SY-LAB