



RiboFlow[®] P/En Detection Kit

Handbuch, Version 1, Juni 2016

Artikelnummer 51-425113

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[®] P/En 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	4
1.4 Sicherheitsinformation	5
1.5 Garantie und Garantiebeschränkung.....	5
1.6 Qualitätskontrolle	6
1.7 Leistungsmerkmale.....	6
1.8 Technischer Service	6
1.9 Einführung.....	6
1.10 Testprinzip.....	7
2. Protokoll.....	7
2.1 Anreicherungen / Kultivierung	7
2.1.1 Anreicherung gemäß ISO 21528.....	7
2.1.2 Verdächtige Einzelkolonien	8
2.2 RiboFlow [®] P/En Lateral Flow Test.....	8
2.2.1 Standardprotokoll für Flüssigkulturen.....	9
2.2.2 Standardprotokoll für die direkte Testung von Einzelkolonien .	11
2.3 Auswertung.....	13
2.4 Wichtige allgemeine Hinweise	16
3. Bestellinformation	18
4. Kurzprotokolle	19
4.1 Kurzprotokoll für Flüssigkulturen	19
4.2 Kurzprotokoll für die direkte Testung von Einzelkolonien	20

1. Allgemeine Informationen

1.1 Kitkomponenten und Lagerungsbedingungen

Solution A, 2 ml

Solution B, 1 ml

Solution C, 2 ml

RiboFlow[®] P/En 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

- Mikropipetten
- Sterile Pipettenspitzen
- Materialien und Medien zum Nachweis von *Pseudomonas* spp. und/oder Enterobacteriaceae
- Inkubator für Anreicherung / Kultivierung von *Pseudomonas* spp. und/oder Enterobacteriaceae
- 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)

1.3 Verwendung / Anwendungsbereich

Der RiboFlow[®] P/En Detection Kit kann zur Detektion von *Pseudomonas* spp. und/oder Enterobacteriaceae aus folgenden Ausgangsmaterialien verwendet werden

- Flüssigkulturen in Anreicherungsmedium, z. B. gemäß ISO 21528-1
- Subkulturen von Anreicherungen oder von Einzelkolonien
- Einzelkolonien von (selektiven) Agarplatten, z. B. gemäß ISO 21528-1

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 *Pseudomonas* spp. und Enterobacteriaceae aus Anreicherungskulturen bzw. die Bestätigung/Differenzierung von verdächtigen Einzelkolonien als Angehörige der Gattung *Pseudomonas* bzw. der Familie der Enterobacteriaceae von (selektiven) Agarplatten zu ermöglichen.

Für jede Charge des RiboFlow® P/En Detection Kits wird ein analytisches Detektionslimit von $2,8 \times 10^{10}$ Kopien (Enterobacteriaceae) bzw. $3,2 \times 10^{10}$ Kopien (*Pseudomonas* spp.) der jeweiligen 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

Manche Vertreter der so genannten „bile-tolerant Gram negative bacteria“, vor allem Pseudomonaden, sind auf VRBG (Violet Red Bile Glucose) Agar von Enterobacteriaceae morphologisch nicht zu unterscheiden. Die Bestätigung als *Pseudomonas* spp. oder als Angehöriger der Enterobacteriaceae erfolgt dann 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[®] P/En Detection Kit wurde entwickelt, um einen hochspezifischen und sehr einfachen Nachweis von Bakterien aus der Familie der Enterobacteriaceae und von Pseudomonaden bzw. deren Unterscheidung innerhalb weniger Minuten mit geringem Arbeits- und Apparatenaufwand zu ermöglichen.

1.10 Testprinzip

Eine für die Gattung *Pseudomonas* sowie eine für die Familie der Enterobacteriaceae spezifische ribosomale RNA-Sequenz werden 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 (z. B. Anreicherungen gemäß ISO 21528-1) und/oder zur Bestätigung von verdächtigen Einzelkolonien von (selektiven) Agarplatten (z. B. gemäß ISO 21528-1 oder -2) vorgesehen.

2.1 Anreicherungen / Kultivierung

2.1.1 Anreicherung gemäß ISO 21528

Die Anreicherung in gepuffertem Peptonwasser erfolgt gemäß ISO 21528-1. Nach der Anreicherung erfolgt die Durchführung des RiboFlow[®] P/En Standardprotokolls für Flüssigkulturen wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben (beachten Sie bitte die wichtigen Hinweise unter 2.2 und 2.4).

2.1.2 Verdächtige Einzelkolonien

Der Ausstrich auf VRBG Selektivplatten erfolgt gemäß ISO 21528-1. Das Ausplattieren von Proben auf VRBG-Gussplatten mit anschließendem Ausstrich verdächtiger Kolonien auf Nähragar erfolgt gemäß ISO 21528-2 (**Hinweis:** Kolonien aus Gussplatten können wegen des Vorhandenseins von Agar in der Probe nicht direkt zur Testung im RiboFlow[®] verwendet werden).

Verdächtige Einzelkolonien mit einem Durchmesser > 2 mm können direkt von der Agarplatte abgenommen und mit dem RiboFlow[®] Standardprotokoll für die direkte Testung von Einzelkolonien wie unter 2.2.2 beschrieben analysiert werden, vorausgesetzt die Platte wurde nicht länger als die vorgeschriebene Zeit inkubiert oder gelagert (beachten Sie bitte die wichtigen Hinweise unter 2.2 und 2.4).

Falls die Platte älter und/oder eine zu testende Kolonie kleiner ist, ist eine Subkultivierung der verdächtigen Einzelkolonie nötig (Transfer der Einzelkolonie in 0,5 ml eines nicht-selektiven Mediums in einem sterilen Reaktionsgefäß, Inkubation bei $+35 \pm 2^\circ\text{C}$ für 3 ± 1 Std., danach Testung laut Abschnitt 2.2.1, beginnend mit dem Zentrifugationsschritt, oder Ausstrich auf frische Platte und Testung laut Abschnitt 2.2.2). Ein solcher Kultivierungsschritt ermöglicht ggf. auch die Isolierung des Bakteriums. Wird eine Kolonie von der ursprünglichen (Selektiv)platte direkt abgenommen und getestet, steht sie für eine Isolierung nicht mehr zur Verfügung.

2.2 RiboFlow[®] P/En 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 $+48^\circ\text{C}$ 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 gemäß ISO 21528-1 und für andere Flüssigkulturen aus nicht-selektiven Medien (z. B. Subkulturen von älteren / gelagerten Anreicherungen oder 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 (6.) beginnen.
5. 0,5 ml der homogenisierten Probe in ein Reaktionsgefäß transferieren.
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 (~135µl) rasch auf den Sample Port einer 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.

Hinweis: 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 für die direkte Testung von Einzelkolonien > 2 mm Durchmesser von Platten - ohne zusätzliche Subkultivierung in Flüssigmedium - geeignet.

Bitte beachten Sie, dass zuerst eine Subkultivierung wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben durchgeführt werden muss, wenn Platten zu lange inkubiert oder gelagert wurden. 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. Eine typische Einzelkolonie 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.

Hinweis: 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).

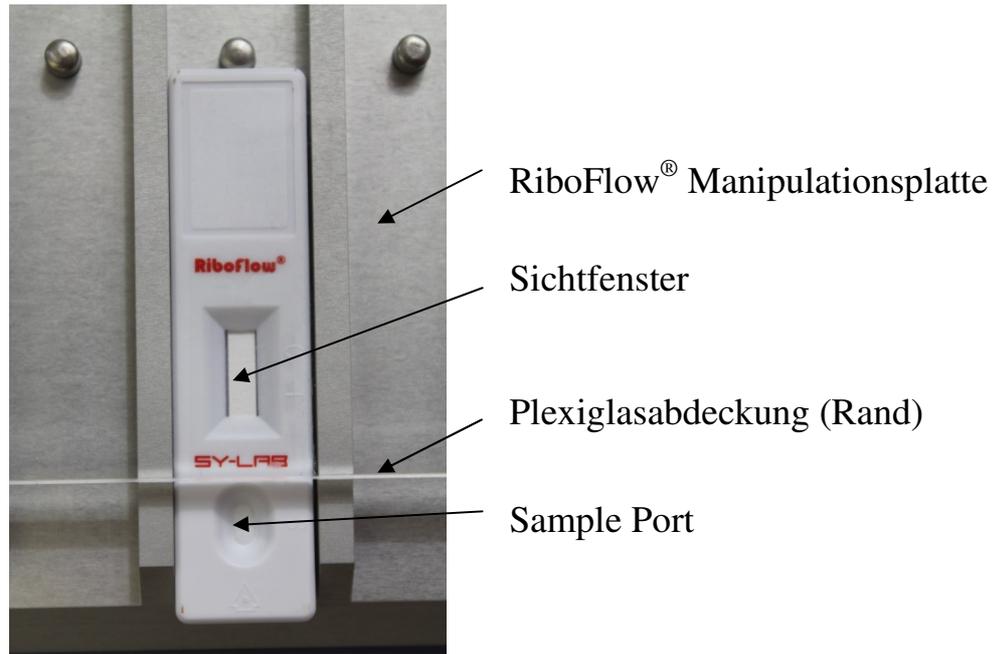


Abb. 1: RiboFlow® Lateral Flow Testkassette

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® P/En Lateral Flow Tests.

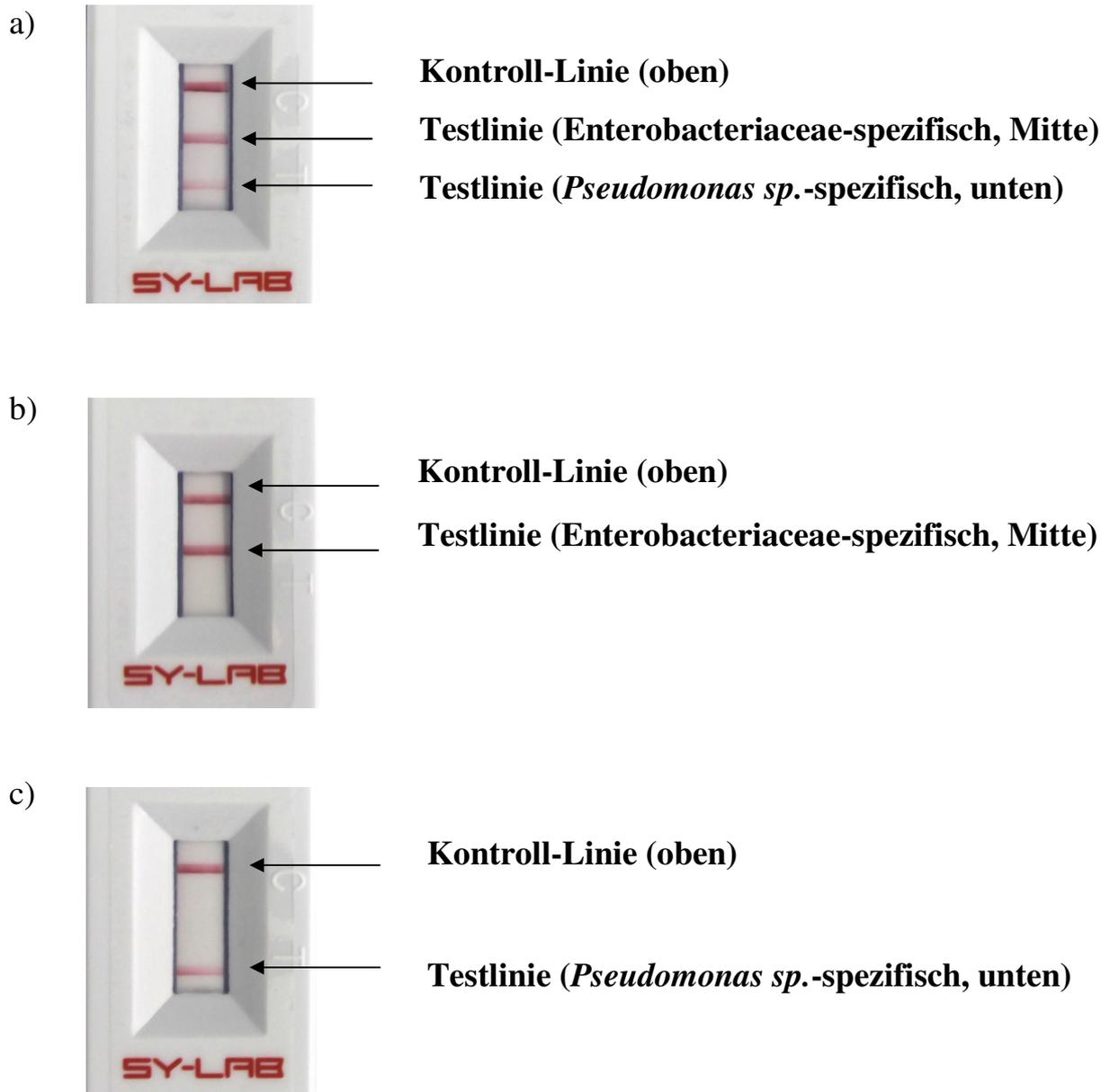


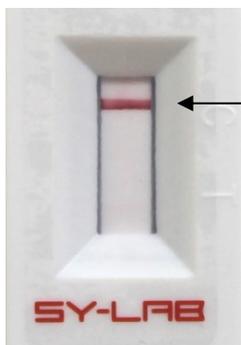
Abb. 2: Positive Resultate:

a) Wenn sowohl die Kontroll-Linie (oben) als auch die beiden Testlinien (die Enterobacteriaceae-spezifische Testlinie in der Mitte und die *Pseudomonas sp.*-spezifische Testlinie unten) im Sichtfenster auftreten, ist das Resultat für beide Organismengruppen positiv.

b) Wenn die Kontroll-Linie (oben) zusammen mit der Enterobacteriaceae – spezifischen Testlinie (Mitte) auftritt, ist das Ergebnis positiv für Enterobacteriaceae.

c) Wenn die Kontroll-Linie (oben) zusammen mit der *Pseudomonas sp.* – spezifischen Testlinie (unten) auftritt, ist das Ergebnis positiv für *Pseudomonas sp.*

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



← **Kontroll-Linie (oben)**

Abb. 3: Negatives Resultat:

Wenn nur die Kontroll-Linie (oben) sichtbar ist, konnten mit dem Test keine Enterobacteriaceae oder *Pseudomonas sp.* detektiert werden, und das Ergebnis ist negativ.



Abb. 4: Ungültiges Resultat: Wenn gar keine Linien auftreten, liegt ein Fehler in der Testdurchführung vor. Ein solches 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[®] P/En Detection Kit**, 24 Tests, Artikelnummer 51-425113
- **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	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 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	

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. Einzelkolonie (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 ± 1Min.
8. Sofortige Auswertung	

SY-LAB