



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
Group**

MAST ISOPLEX® VTEC-Kit

DNA/LYO3 20 Tests

Zur Verwendung mit Real-Time Thermocyclern, die FAM, TAMRA und CY5 detektieren.

Verwendungszweck

Das MAST ISOPLEX® VTEC-Kit ist ein Amplifikationskit zur Typisierung Verotoxin-bildender *E.coli* (VTEC) aus humanen Stuhlproben mittels Loop-initiiertes isothermale Amplifikationsreaktion (LAMP). Hierbei wird die MAST ISOPLEX® Sonden-Technologie verwendet. Dieses Kit enthält Reagenzien zur Detektion der Virulenz-assoziierten Gene von *E.coli*: VTEC-Variante 1 und 2 (VT1 und VT2). Die VT1- und VT2-Gene können gleichzeitig in einem Dreifach-Assay mit entsprechender Inhibitionskontroll-DNA (IC DNA) detektiert werden.

Kit-Komponenten

1. VTEC LAMP Pellets (PEL1): 2 Pellets, Röhrcchen mit rotem Verschluss
2. VTEC Primer- und Sonden-Mischung mit Inhibitionskontroll-DNA (PP1): 2 Röhrcchen, Röhrcchen mit weißem Verschluss
3. Positiv-Kontroll-DNA (VT1VT2): Röhrcchen mit grünem Verschluss
4. Rekonstitutionspuffer (RB): 1 Röhrcchen, Röhrcchen mit gelbem Verschluss
5. Wasser (WTR): 1 Röhrcchen, Röhrcchen 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 -20°C bis zu dem auf dem Röhrcchen 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 Reaktionsröhrcchen, 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-, TAMRA- und CY5-Detektionskanälen zur Erkennung von Amplifikationsprodukten verfügen.

Vorbereitung der Reagenzien

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

Rekonstitution der Reagenzien durchführen wie in Tabelle 1 beschrieben.

Den Inhalt durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mischen.

Jedes Reagenzienröhrcchen ist für 10 Reaktionen ausreichend.

Tabelle 1: Rekonstitution der lyophilisierten Komponenten

Komponente	Diluent	Volumen
PEL1	RB	20 µL
PP1	H ₂ O	10 µL
VT1VT2 DNA	H ₂ O	20 µL

VTEC Assay-Setup

Jedes rekonstituierte PEL1 kann für 10 Reaktionen verwendet werden (10 µL pro Ansatz).

Reaktion durchführen wie in Tabelle 2 beschrieben.

Tabelle 2: VTEC Assay-Setup

VTEC Assay-Setup	Pro Probe
PEL1 in RB rekonstituiert	2 µL
Rekonstituiertes PP1	1 µL
DNA-Probe oder VT1VT2 DNA (Positivkontrolle)	1-7 µL DNA-Probe oder 1 µL der VT1VT2 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

CY5 zur Detektion von VT1

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.

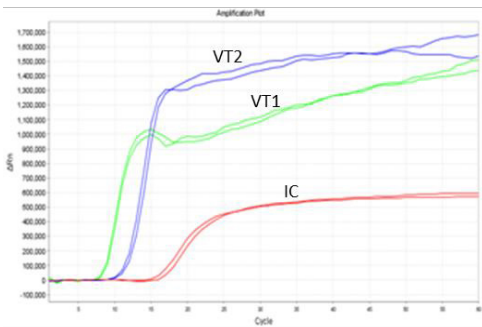
Interpretation der Ergebnisse

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 Dreifach-Assay

A – E.coli VT1- und VT2-Positivkontrolle

A – E.coli VT1 and VT2 Positive Control



B – No template control

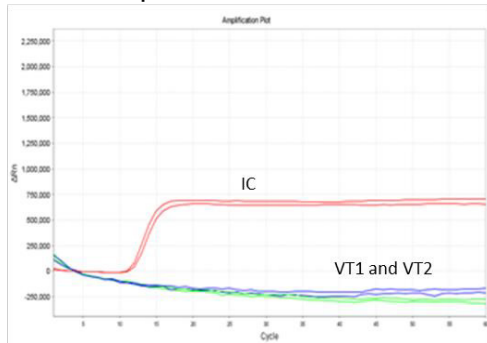


Tabelle 3: Kriterien zur korrekten Interpretation des VTEC Multiplex-Assays mit einer Inhibitionskontrolle (IC)

Kontrollen	Targetgen (VT1 CY5, VT2 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® VTEC-Kits mit dem VTEC-Pellet (PEL1), der Positiv-Kontroll-DNA (VT1VT2), 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 VTEC-positiven Stuhlprobe und einer VTEC-negativen Kultur (n=23).

Sensitivität – 90%
Spezifität – 100%
LOD (Anzahl der Genkopien): VT1: 29
VT2: 24