

HybriScan®D *E.coli*

**Molekularbiologisches Schnelltestsystem
zum Nachweis von *Escherichia coli* in
Lebensmitteln und Wasser**

Produkt-Nr.: 96343



Kontaktinformationen:

HybriScan® - Schnelltestsystem (F&E)

Dr. Helmut Maucher
Phone: (+49) – 3494 – 6364 15
e-mail: contact@scanbec.de

Verkauf

Germany
SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
Free Tel: 0800 51 55 000
Free Fax: 0800 64 90 000
Tel: (+49) 89 6513 0
Fax: (+49) 89 6513 1160

Austria
SIGMA-ALDRICH HANDELS GmbH
Tel: (+43) 1 605 81 90
Fax: (+43) 1 605 81 20

Switzerland
SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
Free Tel: 0800 80 00 80
Free Fax: 0800 80 00 81
Tel: (+41) 81 755 2828
Fax: (+41) 81 755 2815

Technischer Service
flukatec@sial.com

Produktspezifikationen

Kat. – Nr.:	96343
Anzahl der Tests:	96 Bestimmungen, inkl. Standardreihen
Lagerung:	4–8°C, Haltbarkeit 12 Monate
Testdauer:	ca. 2-2,5 Stunden (nach Voranreicherung)
Voranreicherungszeit:	24 Stunden
Sensitivität:	1-10 KBE/l mit Voranreicherung; 5×10^3 KBE ohne Voranreicherung
Spezifität:	<i>Escherichia coli, Shigella</i>

HybriScan®D Testdurchführung

Testprinzip

HybriScan®D ist ein molekularbiologisches Schnelltestsystem zum Nachweis und zur Identifizierung von Mikroorganismen in Lebensmitteln, Getränken, Wasser und Umwelt. Die HybriScan®-Technologie beruht auf dem Nachweis von Mikroorganismen-spezifischen Zielmolekülen mit Hilfe spezieller Fänger- und Nachweissonden durch eine so genannte Sandwich-Hybridisierung. Die in der Probe enthaltenen Zielmoleküle der Mikroorganismen werden durch eine Fängersonde an die Oberfläche einer Bindeplatte gebunden. An die ebenfalls an das Zielmolekül gebundene Nachweissonde wird in einem weiteren Inkubationsschritt ein Enzym gekoppelt. Alle nicht gebundenen Bestandteile werden durch Waschschritte entfernt, so dass ganz spezifisch nur die nachzuweisenden Mikroorganismen erfasst werden. Danach erfolgt durch Zugabe eines Farbsubstrates eine blaue Farbreaktion, die nach dem Abstoppen nach gelb umschlägt. Die Auswertung der Messwerte erfolgt photometrisch durch Absorptionsmessung bei 450 nm durch Vergleich mit den im Testkit enthaltenen Standardlösungen.

Technische Hinweise

Nach Beginn der Testdurchführung alle nachfolgenden Schritte ohne Unterbrechung und innerhalb der angegebenen Zeitgrenzen durchführen.

Für jede Probe eine separate Einmal-Pipettenspitze verwenden, um Verschleppungen bzw. Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Unmittelbar nach Entnahme der Reagenzien die Flaschen wieder verschließen. Dabei darauf achten, dass die Verschlüsse nicht verwechselt werden. Reagenzien nach Benutzung wieder bei der auf dem Etikett angegebenen Temperatur lagern.

Proben und Standards müssen gleichzeitig getestet werden, um gleiche Bedingungen und eine genaue Auswertung zu ermöglichen. Komponenten von Testkits verschiedener Chargen sollten nicht ausgetauscht oder miteinander gemischt werden. Inkubation bei Raumtemperatur bezieht sich auf eine Labortemperatur von 20 bis 25°C. Der Testkit sollte nach dem Verfallsdatum nicht mehr angewendet werden.

Sicherheitshinweise

Sämtliche im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich für *in vitro* Zwecke verwendet werden. Im Labor darf nicht geraucht, gegessen und getrunken werden. Das Pipettieren mit dem Mund ist nicht zulässig.

Testlösung D enthält Formamid. Kontakt mit Haut und Schleimhäuten, sowie das Einatmen vermeiden. Im Notfall bei Hautkontakt mit ausreichend Wasser und Seife spülen bzw. nach dem Einatmen Betroffenen an die frische Luft bringen. Ggf. Arzt konsultieren. Den Kontakt der Stopplösung H (0,50 mol/l Schwefelsäure) mit Haut und Schleimhäuten vermeiden, da sie Hautirritationen oder Verätzungen hervorrufen kann. Im Notfall den betroffenen Hautbereich mit ausreichend Wasser abspülen.

Der Umgang und die Entsorgung sollten entsprechend den nationalen Sicherheitsrichtlinien erfolgen.

Reagenzien und ihre Lagerung

Die Reagenzien sind ausreichend für 96 Bestimmungen inkl. 6 Standardreihen.

Die Kitkomponenten sollten, wie auf den Etiketten angegeben, bei +2 bis +8°C gelagert werden. Der Testkit darf auf keinen Fall eingefroren werden.

Kitkomponenten:

1. Mikrotiterplatte (Platte mit 12 Streifen á 8 Vertiefungen), gebrauchsfertig	1 Stk
2. Bindeplatte (Platte mit 12 Streifen á 8 Vertiefungen), gebrauchsfertig Die unbenutzten Mikrotiterstreifen können in der mit Klebestreifen sorgfältig wieder verschlossenen Originalpackung aufbewahrt werden.	1 Stk
3. Standards 1-4^{a)} (weiße Schraubdeckel); Leerwert sowie verschiedene Konzentrationen synthetisch hergestellter RNA als Positivkontrolle sowie zur Erstellung einer Eichkurve, gebrauchsfertig	je 0,2 ml
4. Lysisreagenz A (roter Deckel), gebrauchsfertig	1,2 ml
5. Lysispuffer B^{a)} (roter Deckel), gebrauchsfertig	4,5 ml
6. Lysispuffer C^{a)} (roter Deckel), gebrauchsfertig	5,5 ml
7. Testlösung D (gelber Deckel), gebrauchsfertig	4,5 ml
8. Waschlösung E^{b)} (blauer Deckel), gebrauchsfertig	90 ml
9. Enzymlösung F (grüner Deckel), vor Gebrauch benötigte Menge 1:100 mit Waschlösung E verdünnen	0,120 ml
10. Substratlösung G^{b)} (grüner Deckel), gebrauchsfertig, vor Gebrauch auf Raumtemperatur temperieren	10 ml
11. Stopplösung H (grüner Deckel) 0,50 mol/l Schwefelsäure, gebrauchsfertig	5 ml
12. Glasbeads (farbloser Deckel), steril, gebrauchsfertig	4 ml

^{a)}Komponenten enthalten SDS, welches bei niedrigen Temperaturen ausfallen kann. Vor Nutzung auf Raumtemperatur äquilibrieren.

^{b)} Vor Nutzung auf Raumtemperatur äquilibrieren.

Zusätzlich benötigte Geräte und Materialien

- 3 Pipetten (2-20 µl, 20-200 µl und 200 µl-1.000 µl) mit entsprechenden Spitzen, optional: Mehrkanalpipette (20-200 µl)
- Zentrifuge für Mikroreaktionsgefäß (1,5 bzw. 2 ml), max. Drehzahl ca. 13.300 U/min
- Thermomixer mit Aufsatz für Mikroreaktionsgefäß und Mikrotiterplatten, temperierbar
- Mikrotiterplatten-Photometer
- Anreicherungsmedium, Brutschrank
- Mikroreaktionsgefäß (2 ml), Kultivierungsröhrchen (12 ml), Reagenzien-Reservoirs
- Optional: Vakuum-Filtrationsanlage, Pinzette, Membranfilterscheiben (0,45 µm)
- Anreicherungsmedium, Brutschrank

Testdurchführung für die Analyse von Lebensmitteln

(1) Probennahme

10 g der zu analysierenden Probe werden in einen sterilen Stomacherbeutel mit Filtermembran eingewogen. Anschließend werden 90 ml LST Bouillon hinzugegeben (1:10 [m/v] Verhältnis von Untersuchungsmenge zum selektiven Anreicherungsmedium). Die Probe wird im Stomacher für 2 Minuten homogenisiert und darauf folgend für 24 Stunden bei 30 °C inkubiert.

Nehmen Sie für jede Probe ein 2ml-Reaktionsgefäß und geben Sie in jedes Gefäß eine Spatelspitze Glasbeads. Entnehmen Sie 2 ml Probe aus Ihrer Vorkultur und zentrifugieren diese für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit von 13.000 rpm. Entfernen Sie anschließend mithilfe einer Pipette sehr vorsichtig und möglichst vollständig das Kulturmedium. Fahren Sie nun mit Punkt 2 (Zelllyse) fort.

Hinweise:

Vermeiden Sie starke Erschütterungen der Probe nach dem Zentrifugieren. Starke Erschütterungen können dazu führen, dass sich die sedimentierten Mikroorganismen von der Gefäßwand lösen. Zentrifugieren Sie ggf. ein zweites Mal. Bedenken Sie, dass ein Zellpellet bei geringer Kontamination meist nicht sichtbar ist!

(2) Zelllyse

Pipettieren Sie 40 µl **Lysispuffer B** (roter Deckel) und 10 µl **Lysisreagenz A** (roter Deckel) zu jeder Probe, mischen Sie die Reagenzien durch kurzes Schütteln und stellen Sie die Proben für 15 min bei 37°C in den vorgeheizten Thermomixer. Fügen Sie anschließend 50 µl **Lysispuffer C** (roter Deckel) dazu und schütteln Sie die Proben bei 37°C und 1.400 rpm für weitere 15 Minuten auf dem Thermomixer. Zentrifugieren Sie die Proben nun 10 Minuten bei 13.000 rpm.

Vorbereitung weiterer Schritte:

Während die Proben zentrifugieren, tauschen Sie die Aufsätze für den Thermomixer und fixieren den Block für Mikrotiterplatten. Stellen Sie den Thermomixer auf 50°C und 500 rpm ein. Pipettieren Sie für jede Probe jeweils 45 µl Testlösung D in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Befüllen Sie zusätzlich die erste Reihe der Mikrotiterplatte (Positionen A1-H1) mit je 45 µl Testlösung D für eine Doppelbestimmung mit den Standards 1 bis 4. Verschließen Sie die Platte mit dem zugehörigen Deckel. Stellen Sie die befüllte Platte mit dem Deckel auf den Thermomixer und lassen Sie die Testlösung für mindestens 5 Minuten bei 50°C und 500 rpm vortemperieren.

Benutzen Sie für jede Nachweisreaktion eine neue, unbenutzte Position Ihrer Mikrotiterplatte!

Hinweise:

Entnehmen Sie das Lysisreagenz nur für den unmittelbaren Gebrauch.

Bei einer größeren Anzahl von Proben kann man zur Erleichterung der Pipettierschritte die entsprechende Menge an Lysisreagenz A und Lysispuffer B unmittelbar vor der Zelllyse in einem separaten Gefäß vereinen und entsprechend jeweils 50 µl des Gemisches einsetzen. Eine solche Mischung sollte nur frisch angesetzt werden, weil eine Lagerung der gemischten Komponenten über einen längeren Zeitraum nicht möglich ist.

(3) Hybridisierung

Nehmen Sie die **Standards 1** bis **4** aus dem Kühlschrank und pipettieren Sie je 10 µl Standard zur Testlösung D in die wie folgt festgelegten Positionen einer Reihe. **Standard 1**: Position A1 und B1, **Standard 2**: Position C1 und D1, **Standard 3**: Position E1 und F1, **Standard 4**: Position G1 und H1.

Entnehmen Sie nun 10 µl aus dem Überstand der lysierten Probe aus Schritt (2) und pipettieren Sie diese in die 45 µl **Testlösung D**. Inkubieren Sie nun die Platte für 10 Minuten bei 50°C und 500 rpm.

Hinweis:

Die Mikrotiterplatte mit der Testlösung verbleibt während der Zugabe der Proben/Standards auf dem Thermomixer, um eine Abkühlung der Testlösung zu vermeiden.

Die verbliebene Probe kann ggf. für spätere Tests bei -20°C eingefroren werden.

(4) Bindung an die Bindeplatte

Überführen Sie 50 µl der Reaktionsgemische aus jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte in die entsprechenden Vertiefungen der Bindeplatte und lassen Sie die Platte mit den Proben weitere 10 Minuten bei 50°C und 500 rpm auf dem Thermomixer schütteln.

Hinweise:

Die unbenutzten Mikrotiterstreifen können in der mit Klebestreifen sorgfältig wieder verschlossenen Originalpackung bei 4°C aufbewahrt werden.

Vorbereitung weitere Schritte:

Entnehmen Sie in der Zwischenzeit pro Probe (inklusive Standards) eine Menge von 100 µl der Waschlösung E (blauer Deckel) und verdünnen in dieser in einem separaten Gefäß die Enzymlösung F (grüner Deckel) 1:100. Beispiel: Für 8 Proben und 8 Standards benötigen Sie 1.600 µl Waschlösung plus 16 µl Enzymlösung F. Kalkulieren Sie einen Pipettierverlust mit ein und bereiten Sie ca. 10% mehr zu.

Hinweise:

Die verdünnte Enzymlösung muss für jeden Test frisch angesetzt und kann in dieser Form nicht über längere Zeit gelagert werden. Nehmen Sie die Enzymlösung F nur für den unmittelbaren Gebrauch aus dem Kühlschrank. Zentrifugieren Sie vor der Entnahme der Enzymlösung das Gefäß kurz, um die Lösung am Gefäßboden zu konzentrieren.

(5) Enzymbindung

Nehmen Sie die Platte vom Thermomixer und entfernen Sie durch Invertieren der Platte die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung. Stellen Sie in der Zwischenzeit den Thermomixer auf 25°C ein. Geben Sie 200 µl **Waschlösung E** (blauer Deckel) in jede Vertiefung und inkubieren Sie ca. 1 Minute. Entfernen Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung. Pipettieren Sie jeweils 100 µl verdünnte Enzymlösung, bestehend aus **Enzymlösung F** (grüner Deckel) und **Waschlösung E** (blauer Deckel) 1:100 verdünnt, in jede Vertiefung. Verschließen Sie die Platte mit dem zugehörigen Deckel. Hat der Thermomixer auf eine Temperatur von mindestens 30°C heruntergekühlt, kann die Platte in den Thermomixer gestellt werden. Es wird nun für 10 Minuten bei eingestellten 25°C und 500 rpm inkubiert.

(6) Waschen

Nehmen Sie die Platte vom Thermomixer und entfernen Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung. Geben Sie 200 µl **Waschlösung E** (blauer Deckel) in jede Vertiefung und inkubieren Sie die Platte 1 min bei 25°C und 500 rpm im Thermomixer. Entfernen Sie nachfolgend die Waschlösung und wiederholen den Waschvorgang noch einmal.

Vorbereitung weitere Schritte:

Schalten Sie das Lesegerät ein und starten Sie den Computer.

(7) Farbreaktion

Pipettieren Sie nun in jede Vertiefung 100 µl **Substratlösung G** (grüner Deckel). Stellen Sie die Platte zurück auf den Thermomixer. Lassen Sie die Platte bei 25°C und 500 rpm schütteln. Nach 2-15 Minuten ist eine Blaufärbung in kontaminierten Proben sichtbar. Vergleichen Sie die Intensität der Färbung des Standards 1 mit der der anderen Standards. Ist im Standard 3 im Vergleich zu Standard 1 eine schwache Blaufärbung sichtbar, können alle Reaktionen durch Zugabe von 50 µl **Stopplösung H** abgestoppt werden. Man kann nach Zugabe der Stopplösung einen Farbumschlag nach gelb beobachten. Geben Sie die Mikrotiterplatte zum Mischen der Lösungen kurz auf den Thermomixer und lassen Sie ca. 10 Sekunden bei 500 rpm mixen. Achten Sie darauf, dass eventuell entstandene Luftblasen entfernt werden müssen.

Auswertung mit HybriScan®-Software

(8) Auswertung mit der HybriScan®-Software

Mit der Option **Ansicht** in der Menüleiste können Sie die für jede Position angezeigten Parameter ein- oder ausblenden. Standardmäßig werden die Nummern der 96 Positionen, der Faktor und die Zellzahl angezeigt (siehe unten). Haben Sie einen Drucker angeschlossen, können Sie diese Darstellung der

Messergebnisse drucken. Alternativ wählen Sie die Option **Report** und tragen Sie bei **Spalte** und **Zeile** die von Ihren Proben belegten Positionen ein.

Bsp.: Bei 16 Proben, inkl. Standards: Spalte 1 bis 3, Zeile A bis H. Klicken Sie auf **Report anzeigen**. Hier sehen Sie im oberen Bereich des Fensters das Ergebnis der mithilfe der Standards durchgeführten Regressionsanalyse in Form einer Regressionsgerade. Die durch rote Punkte angezeigten Messwerte der Standards sollten nah an der Regressionsgeraden (blaue Linie) liegen. Sie können nun über die Option **Drucken** die Ergebnisse ausdrucken und/oder über **Export** für die Verarbeitung in anderen Programmen wie Microsoft Excel exportieren.

Beenden Sie das Programm über die Funktion **Exit**.

Weitere Funktionen:

Über die Funktion **Vorlage erstellen** lassen sich für den routinemäßigen Ablauf die Probennamen immer wiederkehrender Proben (bei gleicher Positionierung) speichern und über die Funktion **Vorlage laden** auf die neuen Messwerte übertragen.

(9) Bewertung der Messergebnisse

Die HybriScan®-Software ermittelt mithilfe der Ergebnisse der Absorptionsmessung und der mitgeführten Standards den Zustand der untersuchten Proben. Auf Grundlage des Standards 1 (Mittelwert beider Messungen) wird ein Faktor ermittelt, um den die untersuchte Probe vom Standard 1 abweicht. Der Standard 1 entspricht einem Anteil von 0 Zellen (Nullprobe). Mit zunehmender Größe des Faktors erfolgt die grafische, farbige Darstellung in der Software von grün über gelb und rot nach schwarz. Diese farbige Darstellung ermöglicht eine schnelle, visuelle Erfassung von kontaminierten Proben. Mithilfe des Mittelwertes des Standards 1 und der Standardabweichung beider Messwerte wird weiterhin eine Bewertung der Probe vorgenommen. Liegt der Messwert der Probe höher als die Summe aus "Mittelwert Standard 1 plus 3mal Standardabweichung beider Messwerte" so wird eine Probe als kontaminiert bewertet.

Aus den Werten der Standardkonzentrationen (S1 bis S4) wird durch Auftragen der Konzentrationen gegen die optische Dichte und lineare Regression eine Eichkurve erstellt. Den optischen Dichten der Proben werden durch Interpolation aus der Eichkurve korrespondierende Zellzahlen zugeordnet.

Die HybriScan®-Software ermöglicht sowohl eine grafische als auch eine tabellarische Darstellung der Testergebnisse für die untersuchten Proben. Es werden optische Dichte und berechnete Zellzahl angegeben.

Leerwert und entsprechende Standards müssen sich unbedingt in den Vertiefungen A1 bis H1 befinden, da sonst eine falsche Auswertung durch die Software erfolgt.

Auswertung ohne HybriScan®-Software

(10) Auswertung der Messergebnisse mit dem VIS-Photometer

Schalten Sie das Lesegerät und Ihren angeschlossenen Rechner mit der installierten Software ein. Öffnen Sie die Software. Stellen Sie die Platte in das Lesegerät. Die Position A1 befindet sich hinten links. Starten Sie die Messung bei 450nm. Das Lesegerät misst nun die Absorption auf allen Positionen der Platte.

(11) Interne Kontrolle

Für eine interne Kontrolle der Testdurchführung empfehlen wir das Mitführen aller vier Standards. Setzen Sie für Standard S1 den Wert 0, Standard S2 1, Standard S3 3 und für Standard S4 den Wert 10 auf der Abszisse (x-Achse). Führen Sie eine lineare Regression mit den korrespondierenden Messwerten für S1 bis S4 durch. Die Gerade muss beim Messwert für Standard S1 die Y-Achse schneiden. Bei korrekt durchgeführten Analysen sollten die Messwerte möglichst nahe der Trendlinie liegen. Die Regressionsgerade dient lediglich der Überprüfung der Analysenqualität und nicht der Quantifizierung. Diese Verfahrensweise wird insbesondere für unerfahrene Anwender empfohlen.

Routinierte Anwender können sich auf Standard S1 und S4 beschränken. Diese werden für die qualitative Auswertung der Ergebnisse benötigt.

(12) Qualitative Auswertung

Für eine gültige Messung soll der Quotient, ermittelt aus dem MW der Positivkontrolle (S4) dividiert durch den MW der Negativkontrolle (S1), einen Wert größer als 4 ergeben.

Die Beurteilung der Proben erfolgt auf der Grundlage folgender Formel:

$$\text{Proben-OD\%}-\text{Wert} = \frac{\text{OD}_{\text{Probe}} - \text{MW OD}_{\text{NK}}}{\text{MW OD}_{\text{PK}} - \text{MW OD}_{\text{NK}}} \times 72,10\%$$

MW Mittelwert
PK Positivkontrolle (S4)
NK Negativkontrolle (S1)

Für eine aussagekräftige Beurteilung der Proben sind die erhaltenen Proben-OD\%-Werte wie folgt zu bewerten:

Proben mit einem Proben-OD\%-Wert kleiner als 10 gelten als negativ.

Proben mit einem Proben-OD\%-Wert von 10 bis < 20 gelten als fraglich.

Proben mit einem Proben-OD\%-Wert ≥ 20 gelten als positiv.

(13) Quantitative Auswertung

Für eine quantitative (semi-quantitative) Auswertung erfolgt die Berechnung der Proben-Zellzahl wie folgt:

$$\text{Zellzahl}_{\text{Probe}} = \frac{\text{OD}_{\text{Probe}} \times \text{Zellzahl}_{\text{Standard}}}{\text{MW OD}_{\text{Standard}}}.$$

Für die Berechnung der Zellzahl den Standard wählen, der der Proben-OD am nächsten liegt.

Zellzahlen der Standards:

S1 = 0

S2 = 1.000

S3 = 3.000

S4 = 10.000

Hinweis:

Eine quantitative Auswertung kann nur erfolgen, wenn die Nachweisgrenze erreicht wurde (siehe Produktspezifikation), die Messwerte im linearen Bereich liegen und keine Voranreicherung durchgeführt wurde!

Kurzprotokoll (Lebensmittel)

1. 10 g der zu analysierenden Probe in einen sterilen Stomacherbeutel einwiegen
2. Herstellung der selektiven Anreicherungssuspension: 90 ml LST Bouillon hinzufügen (1:10 [m/v] Verhältnis von Untersuchungsmenge zum selektiven Anreicherungsmedium)
3. Durchmischen von Probe und LST Bouillon im Stomacher für 2 min
4. Inkubation der Anreicherung im Stomacherbeutel für 24 h bei 30°C
5. 2 ml Probe entnehmen, Glasbeads hinzufügen, zentrifugieren (13.000 rpm, 2 min) und Überstand vorsichtig entfernen
6. Pellet in 40 µl **Lysispuffer B** (roter Deckel) aufnehmen und 10 µl **Lysispuffer A** (roter Deckel) dazu pipettieren; mischen und 15 min bei 37°C im Thermomixer inkubieren, 50µl **Lysispuffer C** hinzufügen und für weitere 15 min bei 1.400 rpm im Thermomixer schütteln
7. 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
8. pro Probe 45 µl **Testlösung D** (gelber Deckel) in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettieren und ca. 5 min bei 500 rpm und 50°C im Thermomixer vortemperieren
9. 10 µl Überstand aus Schritt 4 dazu pipettieren (Reihe A1 – H1 ist für die entsprechenden Standards vorgesehen); Mikrotiterplatte abdecken und 10 min bei 50°C und 500 rpm im Thermomixer inkubieren
10. Überführen von 50 µl der Reaktionsgemische aus jeder Vertiefung in die Bindeplatte, 10 min bei 50°C und 500 rpm im Thermomixer inkubieren
11. Flüssigkeit aus jeder Vertiefung entfernen; 200 µl **Waschlösung E** (blauer Deckel) in jede Vertiefung pipettieren und 2 min bei Raumtemperatur inkubieren
12. Flüssigkeit aus jeder Vertiefung entfernen; 100 µl Enzymlösung (**Enzymlösung F** plus **Waschlösung E**; 1:100) in jede Vertiefung pipettieren; 10 min bei 25°C und 500 rpm im Thermomixer inkubieren
13. Bindeplatte entleeren und mit 200 µl **Waschlösung E** 1 min bei 500 rpm und 25°C waschen; Platte entleeren und erneut waschen
14. je Probe (inkl. Standards) 100 µl **Substratlösung G** (grüner Deckel) in die Vertiefung der Bindeplatte pipettieren; Platte abdecken und ca. 15 min bei 25°C und 500 rpm im Thermomixer inkubieren
15. 50 µl **Stopplösung H** (grüner Deckel) in jede Vertiefung dazu pipettieren
16. Photometrische Signalauslesung bei 450 nm und Auswertung

So funktioniert's (Lebensmittel)



1. Probenvorbereitung & Anreicherung



2. Zellyse
(2 ml Probe, 13.000 rpm;
37°C, 45-60 min)



3. HybriScan®-Testlösung
(Binden der Probe an spezifische Sonden, 10 min)



4. Immobilisierung
(Binden des „Sandwichs“ an Bindeplatte, 10 min)



5. Enzymreaktion
(Kopplung des Enzyms an das Sandwich, 10 min)



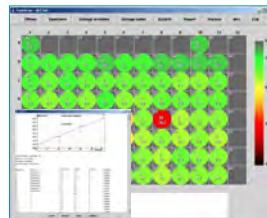
6. Waschen
(Entfernen ungebundener Komponenten, 2x 1 min)



7. Nachweisreaktion
(Farbreaktion und Abstoppen, 10 min)



8. Messsignal auslesen



9. Auswerten
(Auswerten der Messergebnisse, 10 min)

Vorteile

- schnell, sensitiv, zuverlässig
- spezifisch für lebende Zellen
- Zeitersparnis von 2 bis 4 Tagen im Vergleich zu Plattentests
- einfache Handhabung
- minimaler Aufwand bei der Probenvorbereitung
- hoher Probendurchsatz durch 96-Kavitäten Mikrotiterplattenformat
- robuste, kostengünstige Gerätetechnik

Testdurchführung für die Analyse von Wasser

(1) Probennahme

Filtrieren Sie 100-1.000 ml Probe durch einen 0,45 µm Filter. Entnehmen Sie den Filter und lösen Sie mithilfe von Glaskugeln (nicht im Testkit enthalten) und 4 ml der Filtratlösung in einer kleinen Petrischale den Filterrückstand durch leichtes Schütteln für ca. 2 Minuten vom Filter. Alternativ zerkleinern Sie den Filter mit einer Schere in Streifen und geben Sie diese in ein Kulturröhrchen mit 4 ml der Filtratlösung. Zum Ablösen der Bakterien vom Filter wird nun für 30 Sekunden kräftig gemischt (Vortex). Danach entnehmen Sie der Petrischale bzw. dem Kulturröhrchen eine Menge von 2 ml und füllen diese in das vorbereitete 2 ml-Reaktionsgefäß, in das eine Spatelspitze Glasbeads gegeben wurde. Zentrifugieren Sie die Probe für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit von 13.000 rpm. Es werden in der Probe vorhandene Bakterien sedimentiert. Entfernen Sie anschließend mithilfe einer Pipette sehr vorsichtig und möglichst vollständig den Überstand. Wiederholen Sie den Zentrifugationsschritt mit den restlichen 2 ml der Probe. Fahren Sie nun mit Punkt 2 (Zelllyse) fort.

Alternativ entnehmen Sie 2 ml Probe aus Ihrer Vorkultur und zentrifugieren diese für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit von 13.000 rpm. Entfernen Sie anschließend mithilfe einer Pipette sehr vorsichtig und möglichst vollständig das Kulturmedium. Fahren Sie nun mit Punkt 2 (Zelllyse) fort.

Hinweise:

Vermeiden Sie starke Erschütterungen der Probe nach dem Zentrifugieren. Starke Erschütterungen können dazu führen, dass sich die sedimentierten Mikroorganismen von der Gefäßwand lösen. Zentrifugieren Sie ggf. ein zweites Mal. Bedenken Sie, dass ein Zellpellet bei geringer Kontamination meist nicht sichtbar ist!

(2) Zelllyse

Pipettieren Sie 40 µl **Lysispuffer B** (roter Deckel) und 10 µl **Lysisreagenz A** (roter Deckel) zu jeder Probe, mischen Sie die Reagenzien durch kurzes Schütteln und stellen Sie die Proben für 15 min bei 37°C in den vorgeheizten Thermomixer. Fügen Sie anschließend 50 µl **Lysispuffer C** (roter Deckel) dazu und schütteln Sie die Proben bei 37°C und 1.400 rpm für weitere 15 Minuten auf dem Thermomixer. Zentrifugieren Sie die Proben nun 10 Minuten bei 13.000 rpm.

Vorbereitung weiterer Schritte:

Während die Proben zentrifugieren, tauschen Sie die Aufsätze für den Thermomixer und fixieren den Block für Mikrotiterplatten. Stellen Sie den Thermomixer auf 50°C und 500 rpm ein. Pipettieren Sie für jede Probe jeweils 45 µl Testlösung D in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Befüllen Sie zusätzlich die erste Reihe der Mikrotierplatte (Positionen A1-H1) mit je 45 µl Testlösung D für eine Doppelbestimmung mit den Standards 1 bis 4. Verschließen Sie die Platte mit dem zugehörigen Deckel. Stellen Sie die befüllte Platte mit dem Deckel auf den Thermomixer und lassen Sie die Testlösung für mindestens 5 Minuten bei 50°C und 500 rpm vortemperieren.

Benutzen Sie für jede Nachweisreaktion eine neue, unbenutzte Position Ihrer Mikrotiterplatte!

Hinweise:

Entnehmen Sie das Lysisreagenz nur für den unmittelbaren Gebrauch.

Bei einer größeren Anzahl von Proben kann man zur Erleichterung der Pipettierschritte die entsprechende Menge an Lysisreagenz A und Lysispuffer B unmittelbar vor der Zelllyse in einem separaten Gefäß vereinen und entsprechend jeweils 50 µl des Gemisches einsetzen. Eine solche Mischung sollte nur frisch angesetzt werden, weil eine Lagerung der gemischten Komponenten über einen längeren Zeitraum nicht möglich ist.

(3) Hybridisierung

Nehmen Sie die **Standards 1 bis 4** aus dem Kühlschrank und pipettieren Sie je 10 µl Standard zur Testlösung D in die wie folgt festgelegten Positionen einer Reihe. **Standard 1:** Position A1 und B1, **Standard 2:** Position C1 und D1, **Standard 3:** Position E1 und F1, **Standard 4:** Position G1 und H1.

Entnehmen Sie nun 10 µl aus dem Überstand der lysierten Probe aus Schritt (2) und pipettieren Sie diese in die 45 µl **Testlösung D**. Inkubieren Sie nun die Platte für 10 Minuten bei 50°C und 500 rpm.

Hinweis:

Die Mikrotiterplatte mit der Testlösung verbleibt während der Zugabe der Proben/Standards auf dem Thermomixer, um eine Abkühlung der Testlösung zu vermeiden.

Die verbliebene Probe kann ggf. für spätere Tests bei -20°C eingefroren werden.

(4) Bindung an die Bindeplatte

Überführen Sie 50 µl der Reaktionsgemische aus jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte in die entsprechenden Vertiefungen der Bindeplatte und lassen Sie die Platte mit den Proben weitere 10 Minuten bei 50°C und 500 rpm auf dem Thermomixer schütteln.

Hinweise:

Die unbenutzten Mikrotiterstreifen können in der mit Klebestreifen sorgfältig wieder verschlossenen Originalpackung bei 4°C aufbewahrt werden.

Vorbereitung weitere Schritte:

Entnehmen Sie in der Zwischenzeit pro Probe (inklusive Standards) eine Menge von 100 µl der Waschlösung E (blauer Deckel) und verdünnen in dieser in einem separaten Gefäß die Enzymlösung F (grüner Deckel) 1:100. Beispiel: Für 8 Proben und 8 Standards benötigen Sie 1.600 µl Waschlösung plus 16 µl Enzimlösung F. Kalkulieren Sie einen Pipettierverlust mit ein und bereiten Sie ca. 10% mehr zu.

(5) Enzymbindung

Nehmen Sie die Platte vom Thermomixer und entfernen Sie durch Invertieren der Platte die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung. Stellen Sie in der Zwischenzeit den Thermomixer auf 25°C ein. Geben Sie 200 µl **Waschlösung E** (blauer Deckel) in jede Vertiefung und inkubieren Sie ca. 1 Minute. Entfernen Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung. Pipettieren Sie jeweils 100 µl verdünnte Enzimlösung, bestehend aus **Enzimlösung F** (grüner Deckel) und **Waschlösung E** (blauer Deckel) 1:100 verdünnt, in jede Vertiefung. Verschließen Sie die Platte mit dem zugehörigen Deckel. Hat der Thermomixer auf eine Temperatur von mindestens 30°C heruntergekühlt, kann die Platte in den Thermomixer gestellt werden. Es wird nun für 10 Minuten bei eingestellten 25°C und 500 rpm inkubiert.

Hinweise:

Die verdünnte Enzimlösung muss für jeden Test frisch angesetzt und kann in dieser Form nicht über längere Zeit gelagert werden. Nehmen Sie die Enzimlösung F nur für den unmittelbaren Gebrauch aus dem Kühlschrank. Zentrifugieren Sie vor der Entnahme der Enzimlösung das Gefäß kurz, um die Lösung am Gefäßboden zu konzentrieren.

(6) Waschen

Nehmen Sie die Platte vom Thermomixer und entfernen Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung. Geben Sie 200 µl **Waschlösung E** (blauer Deckel) in jede Vertiefung und inkubieren Sie die Platte 1 min bei 25°C und 500 rpm im Thermomixer. Entfernen Sie nachfolgend die Waschlösung und wiederholen Sie den Waschvorgang noch einmal.

Vorbereitung weitere Schritte:

Schalten Sie das Lesegerät ein und starten Sie den Computer.

(7) Farbreaktion

Pipettieren Sie nun in jede Vertiefung 100 µl **Substratlösung G** (grüner Deckel). Stellen Sie die Platte zurück auf den Thermomixer. Lassen Sie die Platte bei 25°C und 500 rpm schütteln. Nach 2-15 Minuten ist eine Blaufärbung in kontaminierten Proben sichtbar. Vergleichen Sie die Intensität der Färbung des Standards 1 mit der der anderen Standards. Ist im Standard 3 im Vergleich zu Standard 1 eine schwache Blaufärbung sichtbar, können alle Reaktionen durch Zugabe von 50 µl **Stopplösung H** abgestoppt werden. Man kann nach Zugabe der Stopplösung einen Farbumschlag nach gelb beobachten. Geben Sie die Mikrotiterplatte zum Mischen der Lösungen kurz auf den Thermomixer und lassen Sie ca. 10 Sekunden bei 500 rpm mixen. Achten Sie darauf, dass eventuell entstandene Luftblasen entfernt werden müssen.

Auswertung mit HybriScan®-Software

(8) Auswertung mit der HybriScan®-Software

Mit der Option **Ansicht** in der Menüleiste können Sie die für jede Position angezeigten Parameter ein- oder ausblenden. Standardmäßig werden die Nummern der 96 Positionen, der Faktor und die Zellzahl angezeigt (siehe unten). Haben Sie einen Drucker angeschlossen, können Sie diese Darstellung der Messergebnisse drucken. Alternativ wählen Sie die Option **Report** und tragen Sie bei **Spalte** und **Zeile** die von Ihren Proben belegten Positionen ein.

Bsp.: Bei 16 Proben, inkl. Standards: Spalte 1 bis 3, Zeile A bis H. Klicken Sie auf **Report anzeigen**. Hier sehen Sie im oberen Bereich des Fensters das Ergebnis der mithilfe der Standards durchgeführten Regressionsanalyse in Form einer Regressionsgerade. Die durch rote Punkte angezeigten Messwerte der Standards sollten nah an der Regressionsgeraden (blaue Linie) liegen. Sie können nun über die Option **Drucken** die Ergebnisse ausdrucken und/oder über **Export** für die Verarbeitung in anderen Programmen wie Microsoft Excel exportieren.

Beenden Sie das Programm über die Funktion **Exit**.

Weitere Funktionen:

Über die Funktion **Vorlage erstellen** lassen sich für den routinemäßigen Ablauf die Probennamen immer wiederkehrender Proben (bei gleicher Positionierung) speichern und über die Funktion **Vorlage laden** auf die neuen Messwerte übertragen.

(9) Bewertung der Messergebnisse

Die HybriScan®-Software ermittelt mithilfe der Ergebnisse der Absorptionsmessung und der mitgeführten Standards den Zustand der untersuchten Proben. Auf Grundlage des Standards 1 (Mittelwert beider Messungen) wird ein Faktor ermittelt, um den die untersuchte Probe vom Standard 1 abweicht. Der Standard 1 entspricht einem Anteil von 0 Zellen (Nullprobe). Mit zunehmender Größe des Faktors erfolgt die grafische, farbige Darstellung in der Software von grün über gelb und rot nach schwarz. Diese farbige Darstellung ermöglicht eine schnelle, visuelle Erfassung von kontaminierten Proben. Mithilfe des Mittelwertes des Standards 1 und der Standardabweichung beider Messwerte wird weiterhin eine Bewertung der Probe vorgenommen. Liegt der Messwert der Probe höher als die Summe aus "Mittelwert Standard 1 plus 3mal Standardabweichung beider Messwerte" so wird eine Probe als kontaminiert bewertet.

Aus den Werten der Standardkonzentrationen (S1 bis S4) wird durch Auftragen der Konzentrationen gegen die optische Dichte und lineare Regression eine Eichkurve erstellt. Den optischen Dichten der Proben werden durch Interpolation aus der Eichkurve korrespondierende Zellzahlen zugeordnet.

Die HybriScan®-Software ermöglicht sowohl eine grafische als auch eine tabellarische Darstellung der Testergebnisse für die untersuchten Proben. Es werden optische Dichte und berechnete Zellzahl angegeben.

Leerwert und entsprechende Standards müssen sich unbedingt in den Vertiefungen A1 bis H1 befinden, da sonst eine falsche Auswertung durch die Software erfolgt.

Auswertung ohne HybriScan®-Software

(10) Auswertung der Messergebnisse mit dem VIS-Photometer

Schalten Sie das Lesegerät und Ihren angeschlossenen Rechner mit der installierten Software ein. Öffnen Sie die Software. Stellen Sie die Platte in das Lesegerät. Die Position A1 befindet sich hinten links. Starten Sie die Messung bei 450nm. Das Lesegerät misst nun die Absorption auf allen Positionen der Platte.

(11) Interne Kontrolle

Für eine interne Kontrolle der Testdurchführung empfehlen wir das Mitführen aller vier Standards. Setzen Sie für Standard S1 den Wert 0, Standard S2 1, Standard S3 3 und für Standard S4 den Wert 10 auf der Abszisse (x-Achse). Führen Sie eine lineare Regression mit den korrespondierenden Messwerten für S1 bis S4 durch. Die Gerade muss beim Messwert für Standard S1 die Y-Achse schneiden. Bei korrekt durchgeführten Analysen sollten die Messwerte möglichst nahe der Trendlinie liegen. Die Regressionsgerade dient lediglich der Überprüfung der Analysenqualität und nicht der Quantifizierung. Diese Verfahrensweise wird insbesondere für unerfahrene Anwender empfohlen.

Routinierte Anwender können sich auf Standard S1 und S4 beschränken. Diese werden für die qualitative Auswertung der Ergebnisse benötigt.

(12) Qualitative Auswertung

Für eine gültige Messung soll der Quotient, ermittelt aus dem MW der Positivkontrolle (S4) dividiert durch den MW der Negativkontrolle (S1), einen Wert größer als 4 ergeben.

Die Beurteilung der Proben erfolgt auf der Grundlage folgender Formel:

$$\text{Proben-OD\%}-\text{Wert} = \frac{\text{OD}_{\text{Probe}} - \text{MW } \text{OD}_{\text{NK}}}{\text{MW } \text{OD}_{\text{PK}} - \text{MW } \text{OD}_{\text{NK}}} \times 72,10\text{D\%}$$

MW Mittelwert
PK Positivkontrolle (S4)
NK Negativkontrolle (S1)

Für eine aussagekräftige Beurteilung der Proben sind die erhaltenen Proben-OD\%-Werte wie folgt zu bewerten:

Proben mit einem Proben-OD\%-Wert kleiner als 10 gelten als negativ.

Proben mit einem Proben-OD\%-Wert von 10 bis < 20 gelten als fraglich.

Proben mit einem Proben-OD\%-Wert ≥ 20 gelten als positiv.

(13) Quantitative Auswertung

Für eine quantitative (semi-quantitative) Auswertung erfolgt die Berechnung der Proben-Zellzahl wie folgt:

$$\text{Zellzahl}_{\text{Probe}} = \frac{\text{OD}_{\text{Probe}} \times \text{Zellzahl}_{\text{Standard}}}{\text{MW } \text{OD}_{\text{Standard}}}.$$

Für die Berechnung der Zellzahl den Standard wählen, der der Proben-OD am nächsten liegt.

Zellzahlen der Standards:

S1 = 0

S2 = 1.000

S3 = 3.000

S4 = 10.000

Hinweis:

Eine quantitative Auswertung kann nur erfolgen, wenn die Nachweisgrenze erreicht wurde (siehe Produktspezifikation), die Messwerte im linearen Bereich liegen und keine Voranreicherung durchgeführt wurde!

Kurzprotokoll (Wasser)

1. 100-1.000 ml Probe filtrieren (Vakuumfiltrationsanlage; Membranfilterscheibe, 0,45 µm Porendurchmesser), Bakterien mit 4 ml Filtratlösung von der Filterscheibe lösen
2. 2 ml entnehmen, Glasbeads hinzufügen, zentrifugieren (13.000 rpm, 2 min) und Überstand vorsichtig entfernen. Zentrifugationsschritt mit den verbliebenen 2ml der Probe wiederholen alternativ 2ml Probe aus Vorkultur entnehmen, Glasbeads hinzufügen, zentrifugieren (13.000 rpm, 2 min) und Überstand vorsichtig entfernen.
3. Pellet in 40 µl **Lysispuffer B** (roter Deckel) aufnehmen und 10 µl **Lysispuffer A** (roter Deckel) dazu pipettieren; mischen und 15 min bei 37°C im Thermomixer inkubieren, 50µl **Lysispuffer C** hinzufügen und für weitere 15 min bei 1.400 rpm im Thermomixer schütteln
4. 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
5. pro Probe 45 µl **Testlösung D** (gelber Deckel) in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettieren und ca. 5 min bei 500 rpm und 50°C im Thermomixer vortemperieren
6. 10 µl Überstand aus Schritt 4 dazu pipettieren (Reihe A1 – H1 ist für die entsprechenden Standards vorgesehen); Mikrotiterplatte abdecken und 10 min bei 50°C und 500 rpm im Thermomixer inkubieren
7. Überführen von 50 µl der Reaktionsgemische aus jeder Vertiefung in die Bindeplatte, 10 min bei 50°C und 500 rpm im Thermomixer inkubieren
8. Flüssigkeit aus jeder Vertiefung entfernen; 200 µl **Waschlösung E** (blauer Deckel) in jede Vertiefung pipettieren und 2 min bei Raumtemperatur inkubieren
9. Flüssigkeit aus jeder Vertiefung entfernen; 100 µl Enzymlösung (**Enzymlösung F** plus **Waschlösung E**; 1:100) in jede Vertiefung pipettieren; 10 min bei 25°C und 500 rpm im Thermomixer inkubieren
10. Bindeplatte entleeren und mit 200 µl **Waschlösung E** 1 min bei 500 rpm und 25°C waschen; Platte entleeren und erneut waschen
11. je Probe (inkl. Standards) 100 µl **Substratlösung G** (grüner Deckel) in die Vertiefung der Bindeplatte pipettieren; Platte abdecken und ca. 15 min bei 25°C und 500 rpm im Thermomixer inkubieren
12. 50 µl **Stopplösung H** (grüner Deckel) in jede Vertiefung dazu pipettieren
13. Photometrische Signalauslesung bei 450 nm und Auswertung

So funktioniert's (Wasser)



1. Probe filtrieren



2. Anreicherung (optional)



3. Zell-Lyse
(2 ml Probe, 13.000 rpm;
37°C, 45-60 min)



4. HybriScan®-Testlösung
(Binden der Probe an
spezifische Sonden, 10 min)



5. Immobilisierung
(Binden des "Sandwichs" an
Bindeplatte, 10 min)



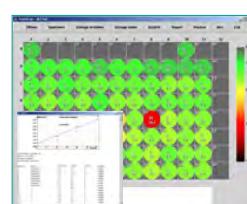
6. Enzymreaktion
Kopplung des Enzyms an
das "Sandwich", 10 min)



7. Waschen
(Entfernen ungebundener
Komponenten, 2x 1 min)



8. Meßsignal auslesen
(Farbreaktion und
Signalauslesung, 15 min)



9. Testauswertung
(Auswerten der Meßergebnisse, 10 min)

Vorteile

- schnell, sensitiv, zuverlässig
- spezifisch für lebende Zellen
- Zeitersparnis von 2 bis 4 Tagen im Vergleich zu Plättentests
- einfache Handhabung
- minimaler Aufwand bei der Probenvorbereitung
- hoher Probendurchsatz durch 96-Kavitäten Mikrotiterplattenformat
- robuste, kostengünstige Gerätetechnik