ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.
Rokycanova 4437/5
615 00 Brno-Židenice, Česká republika
IČ: 26258412, DIČ: CZ26258412
Tel.: +420 542 213 851
E-mail: info@elisabeth.cz
www.elisabeth.cz

EliGene® MTB Isolation Kit

REF 90043-50 (pro 50 vzorků)

Složení soupravy:

Lysozym	5 x 1,4 x 10^6 units
Roztok Proteinázy K	1 ml
Roztok MI1	100 ml
Roztok MI2	6 ml
Roztok MI3	12 ml
Roztok MI4	12 ml
Roztok MI5	27 ml
Roztok MI6	27 ml
Roztok MI7	12 ml
Kolonky	50 ks
2,0 ml zkumavky	100 ks
1,5 ml zkumavky	50 ks
Návod k použití	

Skladování a doba použitelnosti:

Všechny reagencie a komponenty kitu musejí být přepravovány při pokojové teplotě (15 - 30 °C).
Proteináza K a Lysozym musejí být po přepravě skladovány při 2 - 8 °C.
Při dodržení těchto skladovacích podmínek si kit plně udrží svou aktivitu, dokud neuběhne expirační doba uvedená na obalu.

Účel použití

EliGene® MTB Isolation Kit je určen pro izolaci DNA z baktérií rodu *Mycobacterium* a eventuálně dalších mikroorganismů (G+) z klinických materiálů jako sputum, dekontaminované sputum, buněčné kultury, BAL, výpotek, moč, stěry.

Tento kit je optimalizován pro použití s MTB Q-PCR Alert kitem a soupravami EliGene.

Obecný úvod

Při izolaci DNA z baktérií rodu *Mycobacterium* se můžeme setkat s celou řadou problémů zahrnující například inhibice nebo nízkou citlivost. EliGene® MTB Isolation Kit je navržen tak, aby předešel problémům spojených s inhibicí a nízkým výtěžkem izolace DNA. Celkový čas izolace zahrnující dvě 30-ti minutové inkubace je přibližně 2 hodiny. Kit obsahuje všechny komponenty nezbytné pro izolaci DNA včetně mikrozkumavek. Není třeba přidávat etanol ani jiné chemikálie.

Vzorek

Klinický materiál: sputum, dekontaminované sputum, kultivované buňky, BAL, výpotek, moč, stěry

Nezbytné vybavení pro laboratoř

- Automatické pipety a sterilní špičky s filtrem bez DNA, RNA a bez DNáz a RNáz (doporučujeme použít plast s CE certifikací pro diagnostické účely), vortex
- Sterilní stojánek bez DNA, RNA a bez DNáz a RNáz
- Vodní lázeň nebo suchý blok na 37-95 °C
- Mikrocentrifuga (13 000 x g)
- BIOhazard box
- Laboratorní bezpečnostní rukavice

Upozornění

Při používání kitů používejte rukavice. V případě izolace MTB DNA se doporučuje pracovat v BIOhazard boxu. Vyhněte se jakémukoliv kontaktu kůže s reagenciemi. V případě kontaktu kůže s reagenciemi zasažené místo důkladně opláchněte vodou. Nepolykejte reagencie. V případě náhodného užití nebo kontaktu s reagenciemi pročtěte MSDS protokol, který je k dispozici na vyžádání na telefonu 542 213 851 nebo na webových stránkách www.elisabeth.cz Reagencie označené jako hořlavé by měly být drženy od otevřeného plamene a ohně. Vyhněte se kontaktu reagencií s bělidly nebo dalšími oxidačními činidly. Tento kit je určen pro diagnostické použití.

Příprava reagencií

Před začátkem izolace DNA připravte Lyzační pufr: přidejte 1 ml roztoku MI2 do zkumavky s lysozymem a krátce zvortexujte. Tento roztok je stabilní po dobu 14 dnů při 4 °C.

Protokol

1. a) *Sputum, BAL, výpotky a bakteriální kultury*

   Rozsuspendujte vzorek ve stejném objemu roztoku MI1 a centrifugujte při 14000 x g po dobu 10 minut. Je-li vzorek příliš viskózní, přidejte roztok MI1.

   Odstraňte supernatant a pelet resuspendujte ve 100 µl lyzačního pufru (roztok MI2 s lysozymem).

   Inkubujte 30 min při 37 °C.

   b) *Moč, dekontaminované sputum a BAL*

   Vzorek centrifugujte při 14000 x g po dobu 10 minut a resuspendujte pelet ve 100 µl lyzačního pufru (roztok MI2 s lysozymem).

   Inkubujte 30 min při 37 °C.

   c) *Stěry*

   Vložte tampon do mikrozkumavky alespoň se 2ml roztoku MI1 a silně vortexujte 2 minuty. Tampon vyjměte a roztok centrifugujte při 14000 x g po dobu 10 minut.

   Odstraňte supernatant a pelet resuspendujte ve 100µl lyzačního pufru (roztok MI2 s lysozymem).

   Inkubujte 30 min při 37 °C.

2. Přidejte **100 µl roztoku MI3** a **20 µl Proteinázy K.** Použijete-li vyizolovanou DNA k další analýze pomocí MTB Q-PCR Alert kitu, přidejte 20 µl interní kontroly ze soupravy pro detekci patogenu. Vortexujte a inkubujte 30 minut při 65 °C.
3. Ke konci inkubace zvyšte teplotu na 95 °C a směs inkubujte dalších 10 minut. Poté vzorek 1 minutu vortexujte při maximální rychlosti a krátce stočte pro odstranění kapek z víčka. Nechte 5 minut stát, aby se teplota lyzátu snížila na pokojovou teplotu.
4. **Přidejte 100 µl roztoku MI4** a vortexujte 15 sekund. Krátce stočte pro odstranění kapek z víčka a přeneste veškerý obsah zkumavky na kolonku. Centrifugujte 1 minutu při 13 000 x g.
5. Kolonku přeneste do nové 2,0 ml mikrozkumavky. **Přidejte 500 µl roztoku MI5**. Centrifugujte 30 sekund při 13 000 x g. Vyjměte kolonku z mikrozkumavky, obsah mikrozkumavky vylijte do odpadu a vraťte do ní kolonku.
6. Do kolonky **přidejte 500 µl roztoku MI6**. Centrifugujte 30 sekund při 13 000 x g. Vyjměte kolonku z mikrozkumavky, obsah mikrozkumavky vylijte do odpadu a vraťte do ní kolonku. Centrifugujte opět 30 sekund při 13 000 x g, aby došlo k vysušení membrány. Opatrně vyjměte kolonku a přeneste ji do nové 2,0 ml mikrozkumavky aniž byste se dotkli roztoku MI6 na dně původní mikrozkumavky.

Tento dokument je majetkem ELISABETH PHARMACON, spol. s r. o. Je určen ke zveřejnění.

7. **Přidejte 50 µl roztoku MI7** předehřátého na 65 °C. Inkubujte 5 minut při 65 °C. Centrifugujte 1 minutu při 13 000 x g. Odstraňte kolonku a zavřete víčko mikrozkumavky. Genomická DNA je nyní připravena pro různé aplikace.

Interpretace výsledků

Celý proces izolace DNA musí být kontrolován pomocí vnitřní kontroly. Vnitřní kontrola poskytne informaci o účinnosti DNA izolace a o přítomnosti případných inhibitorů. V případě inhibovaných vzorků je nejlepší provést novou izolaci DNA.

Upozornění

Kontaminace laboratorního prostoru je také možná. Používejte proto zvlášť pipety pro MasterMixy, pipety pro pozitivní kontroly a samostatné pipety na DNA vzorky. Dodržujte všechna doporučení pro laboratoře DNA analýz.

Funkční charakteristiky

Diagnostické funkční charakteristiky:

V rámci testování funkční charakteristiky EliGene® MTB Isolation Kitu bylo vyšetřeno celkem 559 klinických vzorků, z toho 518 slepých vzorků ze spádové oblasti pražského regionu (včetně cizinců) a 41 kultivačně ověřených MTB pozitivních vzorků ze spádové oblasti brněnského regionu. Z těchto 559 klinických vzorků bylo MTB pozitivních 52 vzorků. Souprava EliGene® MTB Isolation Kit úspěšně vyizolovala MTB DNA ze všech klinicky MTB pozitivních vzorků. 26 vzorků bylo při PCR inhibováno – tyto vzorky dalšími metodami byly prokázány jako MTB negativní.

Senzitivita izolačního kitu je 100 %. Výpočet senzitivity a účinnosti izolace MTB DNA prováděné soupravou EliDNA MTB Isolation Kit: Na 559 klinických vzorcích (sputa, BALu, moči a výpotky) vykázaly izolační soupravy 100% senzitivitu při izolaci DNA z klinického dekontaminovaného materiálu, což znamená, že při tomto postupu izolace MTB DNA dochází ke 100% k vyizolování dostatečného množství MTB DNA, který je dále zachytitelný metodou následné DNA diagnostiky. Účinnost těchto izolačních souprav je 95,34%, což znamená, že z celkového množství izolovaných vzorků je vyizolováno bez inhibice 95,34 % vzorků.

Negativní výsledek získaný s tímto produktem naznačuje, že DNA MTB nebyla detekována v DNA extrahované ze vzorku, ale může také obsahovat MTB DNA o nižší koncentraci, než je limit detekce pro produkt, v tomto případě by výsledek byl falešně negativní.

Interní kontrola kvality

Během procesu izolace MTB DNA musí být použita interní kontrola pro zamezení falešně negativních výsledků způsobených inhibitory PCR.

Limitace testovacího postupu

- Tato souprava je určena pouze pro následující lidské klinické vzorky: sputum, dekontaminované sputum, BAL, výpotek, moč, stěry. Bakteriální kultury mohou být také použity.
- Tato sada není určena pro izolaci MTB DNA z krve.
- Výsledky získané pomocí tohoto produktu jsou závislé na správném odběru, transportu, uchování a zpracování vzorků. K zamezení chybných výsledků je nutné dodržovat pokyny uvedené v tomto návodu.

- K zamezení chybných výsledků musí být tento produkt používán osobou zkušenou v provádění molekulárně-biologických metod, jako jsou izolace, amplifikace a detekce nukleových kyselin.
- K zamezení falešně pozitivních výsledků je nutné oddělit místa pro izolaci/přípravu amplifikační reakce a pro amplifikaci/detekci produktů amplifikace.
- Získané výsledky musejí být interpretovány s ohledem na výsledky dalších laboratorních testů (kultivace, mikroskopie, atd.) a s ohledem na klinický stav pacienta.

Varování a bezpečnostní opatření

Tato souprava je určena výhradně k použití *in vitro*.

Obecná varování a bezpečnostní opatření

- Pracujte se všemi biologickými vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem. Vyhněte se přímému kontaktu s biologickými vzorky. Vyhněte se rozlití vzorků a tvorbě aerosolů. Jakýkoliv materiál, který přišel do styku s biologickými vzorky, musí být před umístěním do odpadu autoklávován při 121 °C nejméně 60 minut.
- Pracujete se všemi reagenciemi a používaným materiálem s vědomím, že mohou přenášet infekční agens. Vyhněte se přímému kontaktu s reagenciemi. Odpad musí být likvidován v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy. Spotřební materiál musí být spálen. Tekuté odpady obsahující kyseliny nebo zásady musejí být před likvidací zneutralizovány.
- Používejte vhodné ochranné oblečení, rukavice a ochranu očí a obličeje.
- Nikdy nepipetujte roztoky ústy.
- Nejezte, nepijte. Nekuřte a neaplikujte kosmetiku v laboratorních prostorách.
- Řádně si umyjte ruce po práci se vzorky a reagenciemi.
- Likvidujte zbylé reagencie a odpad v souladu s adekvátními bezpečnostními předpisy.
- Před započetím práce si řádně přečtěte veškeré instrukce uvedené v tomto návodu.
- Při práci postupujte přesně podle návodu k použití.
- Kit nepoužívejte po době exspirace, která je uvedena na obalu.
- Používejte pouze reagencie poskytované v rámci kitu a reagencie doporučené výrobcem.
- Nemíchejte reagencie z různých šarží!
- Nepoužívejte reagencie ze souprav jiných výrobců!

Varování a bezpečnostní opatření pro molekulární biologii

- Molekulárně-biologické postupy jako jsou izolace nukleové kyseliny, reverzní transkripce, amplifikace a detekce vyžadují kvalifikovaný personál z důvodu zamezení chybných výsledků, speciálně vzhledem k degradaci nukleových kyselin obsažených ve vzorcích a k možné kontaminaci.
- Je nezbytné mít k dispozici samostatnou místnost pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci. Zabezpečte, aby se produkt amplifikace nikdy nedostal do místnosti pro extrakci nukleových kyselin nebo do místnosti pro přípravu amplifikačních směsí.
- Je nezbytné používat vhodné laboratorní pláště, rukavice a pomůcky určené pro izolaci nukleových kyselin nebo pro přípravu amplifikačních směsí nebo pro detekci. Nikdy nepřenášejte laboratorní pláště, rukavice a pomůcky mezi místnostmi pro extrakci nukleových kyselin, pro přípravu amplifikačních směsí a pro detekci.

- Vzorek, ze kterého se analýza provádí, musí být hned od počátku pro DNA analýzu určen a musí s ním být podle toho nakládáno, např. vzhledem k možné kontaminaci, degradaci nukleových kyselin atd. Vzorek musí být zpracováván v laminárním boxu. Různé vzorky nesmějí být otevřeny ve stejnou dobu. Automatické pipety užívané pro práci s biologickými vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- Automatické pipety užívané pro práci se vzorky musejí být používány pouze pro tuto specifickou práci a musejí být používány špičky s filtrem. Používané špičky musejí být sterilní a prosté DNA/RNA a DNáz a RNáz.
- S produkty amplifikace je třeba zacházet velmi opatrně, aby nedošlo k jejich rozptýlení do prostředí laboratoří a k případné kontaminaci nově testovaných vzorků.

Varování a bezpečnostní opatření týkající se složek této soupravy

- Použité roztoky nesou následující bezpečnostní věty (P; H):

Roztok MI1

P280	Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.
P281	Používejte požadované osobní ochranné prostředky.

Roztok MI2

P280	Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít
P281	Používejte požadované osobní ochranné prostředky.

Roztok MI3

H302+H332	Zdraví škodlivý při požití nebo při vdechování.
H315	Způsobuje vážné podráždění kůže.
H319	Způsobuje vážné podráždění očí.
P261	Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů.
P280	Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.
P301+P312+P330	PŘI POŽITÍ: Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO /lékaře. Vypláchněte ústa.
P304+P340+P312	PŘI VDECHNUTÍ: Přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání. Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO /lékaře. Vypláchněte ústa.
P305+P351+P338	PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny, a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.
P337+P313	Přetrvává-li podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

Roztok MI4

H225	Vysoce hořlavá kapalina a páry.
H319	Způsobuje vážné podráždění očí.
H336	Může způsobit ospalost nebo závratě.
P210	Chraňte před teplem, horkými povrchy, jiskrami, otevřeným ohněm a jinými zdroji zapálení. Zákaz kouření.
P233	Uchovávejte obal těsně uzavřený.
P305+P351+P338	PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny, a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.

Roztok MI5

H225	Vysoce hořlavá kapalina a páry.
H315	Způsobuje vážné podráždění kůže.
H319	Způsobuje vážné podráždění očí.
P210	Chraňte před teplem, horkými povrchy, jiskrami, otevřeným ohněm a jinými zdroji zapálení. Zákaz kouření.
P280	Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

Roztok MI6

H225	Vysoce hořlavá kapalina a páry.
H315	Způsobuje vážné podráždění kůže.
H319	Způsobuje vážné podráždění očí.
P210	Chraňte před teplem, horkými povrchy, jiskrami, otevřeným ohněm a jinými zdroji zapálení. Zákaz kouření.
P280	Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

Roztok MI7

P280	Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.
P281	Používejte požadované osobní ochranné prostředky.

Roztok Proteinázy K

H334	Při vdechování může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu nebo dýchací potíže.
P304+P340	PŘI VDECHNUTÍ: Přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání.
P261	Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů.
P342+P311	Při dýchacích potížích: Volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře/…
P284	Používejte vybavení pro ochranu dýchacích cest.

Lysozyme

H335	Může způsobit podráždění dýchacích cest.
P260	Nevdechujte prach/dým/plyn/mlhu/páry/aerosoly.

Literatura

Barbara A. Bannister, Norman T. Begg and Stephen H. Gillespie: Infectious Disease. Blackwell Science, 2th Ed., 2000

Vysvětlivky



Katalogové číslo



Horní teplotní hranice



Číslo šarže



Spotřebujte do (poslední den v měsíci).



Diagnostický zdravotnický prostředek *in vitro*



V souladu s požadavky Evropské Direktivy 98\79\EEC pro diagnostické zdravotnické prostředky *in vitro*.



Obsah dostatečný pro "N" testů



Prosím, řiďte se instrukcemi pro použití.



Výrobce

Výrobce

ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o.
Rokycanova 4437/5, 615 00 Brno, Česká republika Tel.: +420 542 213 851, +420 542 213 827
E-mail: info@elisabeth.cz