

1. Verwendungszweck	Art.-Nr.: KE09006
Der Testkit MutaGEL® Parodontitis erlaubt die Bestimmung von Leitkeimen der chronischen Parodontitis sowie ergänzend der aggressiven juvenilen Parodontitis und der nekrotisierenden ulzerativen Gingivitis. Ausgangsmaterial der Bestimmung ist (aus der Zahnfleischtasche) isolierte Bakterien-DNA.	

2. Einleitung
Von den mehreren hundert Bakterienarten, welche die menschliche Mundhöhle besiedeln, vermehren sich einige unter pathologischen Bedingungen als Leitkeime sehr stark. Je nach diagnostischer Ausgangslage sollte der Nachweis folgender Leitkeime geführt werden:
A) bei der Verdachtsdiagnose " chronische Parodontitis " müssen Porphyromonas gingivalis und Tannerella forsythensis (früher Bacteroides forsythus) bestimmt werden. Zusätzlich ergänzt wird diese Diagnose durch den Nachweis der Massenvermehrung von Fusobacterium nucleatum .
B) bei der Verdachtsdiagnose " aggressive Parodontitis " (häufig bei jüngeren Patienten) reicht der Nachweis der Massenvermehrung des charakteristischen Anaerobiers Actinobacillus actinomycetemcomitans aus.
C) bei der Verdachtsdiagnose " nekrotische ulzerative Gingivitis " reicht der Nachweis der Massenvermehrung von Prevotella intermedia aus.
<i>Gramnegativ</i> sind Tannerella, Porphyromonas, Actinobacillus und Prevotella. <i>Grampositiv</i> ist Fusobacterium.
Die Zusammensetzung des Artenpools und sein relativer Keimzahlanteil innerhalb der kranken Zahntasche können wechseln oder oszillieren – typisch für eine entzündende Parodontitis ist jedoch immer eine Keimdichteerhöhung um den Faktor 10^4 bis 10^5 am Ort. Für den Zweck der „Keimzahlbestimmung“ dient der universelle 16S-RNA Primer-Mix.

3. Testprinzip
Mit den 5 enthaltenen Primermischungen kann prinzipiell die Anwesenheit von <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Tannerella forsythensis</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , sowie <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> oder <i>Prevotella intermedia</i> je für sich bestimmt werden. Der Kundige wird also je nach diagnostischer Fragestellung den erforderlichen Artenset auswählen. Ein weiteres Primergemisch für die 16S-RNA-Region, das bei allen Bakterien anspricht, erlaubt eine optische Mengeneinschätzung des Bakteriengehaltes der Probe (analog der klassischen Keimzahl). Je nach Fragestellung können einzelne bzw. mehrere Keime bestimmt werden. Der Testkit ist für den Nachweis von jeweils 3 spezifischen Erregern ausgelegt, wie z.B. bei der „chronischen Parodontitis“ notwendig. Alle Amplimere sind verschieden lang, so daß sie auf dem Gel einfach unterschieden werden können.

4. Inhalt der Testpackung (3x 24 Bestimmungen nach diagnostischer Fragestellung)				
■	Primer TF (Tannerella forsythensis)	1 x	70 µl (weiß)	- Lösungen mit den für die jeweiligen Parodontitisbakterien spezifischen Oligonukleotiden.
■	Primer PG (Porphyromonas gingivalis)	1 x	70 µl (braun)	
■	Primer AA (Actinobacillus actinomycetemcomitans)	1 x	70 µl (violett)	
■	Primer PI (Prevotella intermedia)	1 x	70 µl (grün)	
■	Primer FN (Fusobacterium nucleatum)	1 x	70 µl (blau)	
■	Primer 16 (bakterielle 16S-RNA)	1 x	70 µl (transparent)	- Lösung mit bakteriellen 16S-RNA spezifischen Oligonukleotiden.
■	PCR- Mix	1 x	1,5 ml (gelb)	- gebrauchsfertige PCR-Reagenzien (Taq, MgCl ₂ , dNTP, Puffer).
■	Positiv-Kontroll-DNA	1 x	30 µl (rot)	- gepufferte Lösung mit (amplifizierter) DNA der meisten Leitkeime (mit Ausnahme von Prevotella intermedia).

5. Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel
Reagenzien und Instrumente:
- DNA-Extraktionskit, geeignet für <i>grampositive</i> Bakterien. - H₂O (Reinstwasser) - Thermocycler und Mineralöl (optional, für Thermocycler ohne beheizbaren Deckel) - Pipetten (0,5 -1000 µl) und sterile Spitzen (mit Filter) - Sterile Reagenzgefäße - Reagenzien für die Gelelektrophorese - Geräte für die Gelelektrophorese

6. Stabilität und Aufbewahrung
Die Aufbewahrung erfolgt bei ≤ -18°C. Bei korrekter Lagerung sind die Reagenzien mindestens bis zum Verfallsdatum (auf jeder Einzelverpackung aufgedruckt) stabil. Es empfiehlt sich, die Kontroll-DNA der Bakterienisolate nur zweimal aufzutauen und daher bei Bedarf zu aliquotieren. <i>Vor Gebrauch:</i> Alle Gefäße sollten vor dem Öffnen für einige Sekunden zentrifugiert werden, um die Lösung am Gefäßboden zu sammeln.

7. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen
- Nur zur in vitro-Diagnostik - Test nur durch geschultes Personal nach GLP (Good Laboratory Practice)- Richtlinien durchführen lassen. - Testkit nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden. - Alle in der Testpackung enthaltenen Reagenzien/ Reaktionsgefäße können nach ihrer Verwendung im Restmüll entsorgt werden. - Die PCR-Technologie ist extrem sensitiv. Die Amplifikation eines einzelnen Moleküls generiert Millionen identischer Kopien. Daher in drei räumlich voneinander abgetrennten Bereichen für a) Probenaufbereitung, b) PCR-Reagenz-Vorbereitung und c) DNA-Detektion arbeiten. - sterile Spitzen mit Filter und für PCR-Zwecke geeignete Pipetten verwenden (für jeden Bereich sollte ein extra Pipettensatz reserviert werden). - Für jeden separaten Arbeitsplatz neue Handschuhe und extra Kittel benutzen. - Die Laboroberflächen sollten regelmäßig von Nukleinsäuren dekontaminiert werden. - Aerosolbildung (vor allem beim Öffnen der Reaktionsgefäße) unbedingt vermeiden. - Copyright: die Urheberrechte für die Entwicklung vorliegender Kitmethode liegen bei Dr.M.Eßrich, Denzlingen/Freiburg.

Analyseverfahren

Das Untersuchungsprotokoll gliedert sich in drei Phasen:

1. Behandlung zur Probenaufarbeitung.
2. Amplifikation mit den für die bakteriellen Leitkeime spezifischen Primern.
3. Analyse der Bakterienmenge durch gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate

8. Behandlung zur Probenvorbereitung

- Die genomische DNA aus ca. 200 µl Aufschwemmung eines Zahnfleischtaschenabstrichs extrahieren, indem ein handelsüblicher DNA-Extraktionskit für Bakterien-DNA (der auch grampositive Arten lysiert) entsprechend der jeweiligen Anleitung des Herstellers eingesetzt wird.
- Falls die Amplifikation nicht unverzüglich durchgeführt wird, sollte die DNA bei $\leq -18^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden.

9. Amplifikation

- Jede Durchführung sollte eine Positiv- und Negativ-Kontrolle beinhalten.
- Für jede einzelne Probe, die jeweilige Positiv-Kontrolle und die Negativ-Kontrolle gilt folgender Master-Mixplan (das Reaktionsvolumen mit der Anzahl **N** der auszuführenden Reaktionen multiplizieren und 10% Volumen zum Ausgleich der Pipettiergenauigkeit addieren).
- Das Gesamtvolumen des PCR-Reaktionsansatzes ist 25 µl.

PCR- Reagenzien	Ansatzvolumen: 25 µl	Master-Mix- Volumen
1 Primer-Mix eines Parodontitisekmes	2,5 µl	2,5 µl x N + 10 %
PCR- Mix	17,5 µl	15,0 µl x N + 10 %

- je **20 µl** des PCR-Mix (mit dem jeweiligen Parodontitisekme) in ein steriles PCR-Gefäß aliquotieren.
- Proben: 5 µl der **extrahierten DNA** zum Master-Mix-Ansatz zupipettieren.
- Positiv-Kontrolle: 5 µl der **Positiv-Kontroll-DNA** zum Master-Mix-Ansatz zupipettieren.
- Negativ-Kontrolle: 5 µl **H₂O** (Reinstwasser) zum Master-Mix-Ansatz zupipettieren.
- Die Gefäße in den Thermocycler einstellen (falls notwendig, mit ca. 60 µl Mineralöl überschichten).
- Folgendes Amplifikations-Protokoll durchführen:

Anfangsphase:	94°C für 15 min
38 Zyklen:	94°C für 60 sec / 54°C für 60 sec / 72°C für 60 sec
Endphase:	72°C für 5 min, danach 4°C

10. Untersuchung der PCR-Produkte und Interpretation der Resultate

- Gelelektrophorese in **1-2%** Agarose (oder 10% Polyacrylamid) für ca. **100 Vh** (z.B. 80 min bei 85 volt) in 1xTBE-Puffer durchführen: dazu ca. **15 µl** jeden Amplifikats mit ca. **4 µl** Ladepuffer versetzen und auf das Gel laden. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente kann über einen geeigneten DNA-Molekulargewichts-Standard abgeglichen werden. Die im Gel aufgetrennte DNA wird im Ethidiumbromid- bzw. SybrGreen- Bad (5 µg/ml) für ca. 5 min angefärbt und unter UV-Licht (312 nm) visualisiert.
- Zur Durchführung der Gelelektrophorese können 5x TBE-Laufpuffer (Art.-Nr.:KAN10060), 6x Ladepuffer (Art.-Nr.: KAN01070), pUC/MspI - Molekulargewichts-Standard (KBR311005) und (bei Verwendung von Polyacrylamid-Gelen) Fertiggele (Art.-Nr.: KAN20112) eingesetzt werden.
- Die PCR liefert für alle **Bakterienarten** charakteristische Fragmente **zwischen 120 und 300 bp** und für die **16S-DNA von 489 bp**.
- Die relative Gesamtkeimzahl kann an der Helligkeit der 16S-DNA-Bande eingeschätzt werden. Das Vorhandensein und die Keimzahl der einzelnen Bakterienarten kann mit Hilfe des Vorhandenseins und der Helligkeit der artspezifischen Banden (siehe unten) beurteilt werden.

DNA-Sequenz	Fragmentlängen (in bp):
bakterielle 16S-DNA	489
Prevotella intermedia	300
Actinobacillus actinomycetemcomitans	220
Fusobacterium nucleatum	180
Porphyromonas gingivalis	161
Tannerella (Bacteroides) forsythensis	120

- Die Amplifikation der Negativ-Kontrolle darf keinesfalls eine Bande der angegebenen bakteriellen Fragmentlängen ergeben. Sie kann eine leichte Bande der 16S-DNA von der Herstellung der Taq-DNA zeigen, die jedoch Background ist.
- Die Anzahl der PCR-Zyklen erzeugt Produkte im exponentiellen Bereich der Produktvermehrung, so daß ein Rückschluß auf die Dichte der pathogenen Keime möglich wird. Eine leichte Bande wird eine relativ normale Besiedlung, eine stärkere eine unnormale Vermehrung und eine sehr starke einen pathogenen Zustand charakterisieren. Die Bandenhelligkeit kann auch densitometrisch gemessen werden.

11. Einschränkungen

Die PCR liefert für die Positivkontrollen die angegebenen DNA-Fragmente und für die Proben-DNA zumindest das Amplifikat des bakteriellen 16S-RNA-Gens bei 489 bp. Falls dies nicht der Fall ist, müssen die gewählten PCR-Bedingungen überprüft/ korrigiert werden bzw. die DNA-Proben erneut frisch aus der Zahnfleischtaschenaufschwemmung isoliert und untersucht werden.

1. Intended Use	Code: KE09006
The test kit "MutaGEL® Parodontitis" allows the detection of a selection of up to three from the five major pathogens (<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Tannerella forsythensis</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> and <i>Prevotella intermedia</i>) leading to chronic parodontitis, aggressive juvenile parodontitis and necrotic ulcerative gingivitis. Matrix for this analysis is bacteria-DNA isolated from gingival pocket.	

2. Introduction
Parodontitis is the main cause of teeth-lost in adults. The mucous membranes of healthy human cavity of the mouth are colonized with billions of microorganisms. The different species (about 300) secrete growth factors and inhibitors thereby regulating their own number. This ecological system of microorganisms is in permanent steady state. Beside the physiological bacteria also pathogen organisms will grow up in the mouth (more precise in the gingival pocket). An excessive amplification of these pathogens disturbs the physiological balance and favours development of parodontitis (making a therapy with antibiotics necessary). Once started, parodontitis leads in its further course to slow degradation of the parodontium. This stage begins mostly at the age of 30-35 years resulting in first teeth losts at the age of 40 years (if no treatment occurs).
Diagnostic questions are A) chronic parodontitis (<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Tannerella forsythensis</i> , <i>Fusobacterium necrotum</i>), B) aggressive parodontitis in younger patients (<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>) and C) necrotic ulcerative gingivitis (<i>Prevotella intermedia</i>)

3. Principle of the Test
The kit „MutaGEL® Parodontitis“ contains different sets of primer which amplify each a specific sequence of the following pathogens: <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Tannerella forsythensis</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> and <i>Prevotella intermedia</i> . Additionally, with primers for a highly conserved region of <i>bacterial 16S-RNA</i> gene, an optical quantification of all detected pathogens can be done (analogous to the classical determination of germ numbers). In dependence of the diagnostic question a set (up to 3) of the required primers must be chosen. Subsequently, the single pathogens are analysed in parallel and all generated amplicons have different sizes allowing a separation by classical gel-electrophoretic methods.

4. Material Supplied (3x24 determinations)			
▪	Primer TF (<i>Tannerella forsythensis</i>)	1 x	70 µl (white)
▪	Primer PG (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)	1 x	70 µl (brown)
▪	Primer AA (<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>)	1 x	70 µl (violet)
▪	Primer PI (<i>Prevotella intermedia</i>)	1 x	70 µl (green)
▪	Primer FN (<i>Fusobacterium nucleatum</i>)	1 x	70 µl (blue)
▪	Primer 16 (bakterial 16S-RNA)	1 x	70 µl (transparent)
▪	PCR-Master Mix	2 x	600 µl (yellow)
▪	Positive control DNA	1 x	30 µl (red)
▪	H ₂ O (deionized)	1 x	600 µl (transparent)

- solution of oligonucleotids specific for bacteria leading to parodontitis.

- ready to use PCR reagent (**2x**; *hot start* Taq enzyme, MgCl₂, dNTP)

- buffered solution with (amplified) DNA of most pathogens leading to parodontitis (except *Prevotella intermedia*).

5. Materials Required but not Supplied
Reagents and instruments:
- DNA extraction kit (e. g. BLOOD MINIPREP: KBR3005) - thermal cycler and mineral oil (optional, for thermocycler without heated lid) - pipettes (0.5 - 200 µl) and sterile pipette tips - sterile micro tubes suitable for the thermal cycler in use - instruments for gel electrophoresis

6. Storage and Stability
Store at ≤ -18°C. The reagents are stable in the unopened micro tubes until the expiration date indicated (see print on the package). Do not thaw out the content of the positive control DNA for more than two times. If necessary, make suitable aliquots.
<i>Before use:</i> Spin tubes briefly before opening (contents may become dispersed during shipment).

7. Warning and Precautions
- For in vitro diagnostic use only. - Test should only be performed only by skilled persons considering GLP (Good Laboratory Practice) guidelines. - Don't use the kit after its expiration date. - After usage, dispose all reagents and test components included in the kit in conventional garbage. - PCR technology is extremely sensitive. The amplification of a single DNA molecule generates million identical copies. Therefore set up three separate working areas for a) sample preparation, b) PCR reagent preparation and c) DNA detection. For each working area a different set of pipettes should be reserved. - Wear separate coats and gloves in each working area and avoid aerosols. - Use sterile filter tips for pipetting and use special PCR pipettes for aerosol free pipetting. - Routinely decontaminate your pipettes and the laboratory benches.

Procedure

The complete procedure is divided in three steps:

1. Sample preparation.
2. Amplification with primers specific for pathogens leading to parodontitis.
3. Detection of the amplified DNA by gel electrophoresis.

8. Sample Preparation

- Extract bacterial DNA (from 200 µl of gingival pocket lavage) using a commercial available DNA isolation kit (suitable also for lysis of gram-positive microorganisms) according to the manufacturer's instructions.
- Start immediately with the amplification procedure or store the extracted DNA at ≤ -18°C.

9. Amplification

- Every set of amplifications should include a positive and a negative control.
- Prepare for each sample, positive controls and negative control the following Master-Mix (multiply the volumes necessary for each reaction with the number **N** of reactions and add 10% more volume). The total volume in the final PCR reaction (with template) is **30 µl**.

PCR reagents	Reaction Volume: 25 µl	Master Mix Volume
1 Primer Mix of Pathogen	2.5 µl	2,5 µl x N + 10 %
PCR Master Mix (ready to use)	15.0 µl	15.0 µl x N + 10 %
H ₂ O (deionized)	7.5 µl	7.5 µl x N + 10 %

- For each reaction aliquot **25 µl** of the Master Mix into a sterile microtube suitable for the thermal cycler
- Samples: add **5 µl** of **extracted DNA** to the Master Mix.
- positive control: add **5 µl** of **positive control DNA** to the respective Master-Mix.
- negative control: add **5 µl** of **H₂O** to the Master-Mix.
- Transfer the micro tubes into the thermal cycler (if necessary overlay the Mix with 60 µl of mineral oil).
- Perform the following amplification protocol:

Initial Hold:	94°C for 15 min
38 cycles:	94°C for 1 min / 54°C for 1 min / 72°C for 1 min
Final Hold:	72°C for 5 min, follow up 4°C

10. Detection of the Amplified DNA

- Carry out gel electrophoresis in **2%** agarose (or polyacrylamide 10%) for at least **100 Vh** (e. g. 80 min at 85 volt) in 1xTBE-buffer: mix about **15 µl** of each digestion mix with **4 µl** loading buffer (e.g. KAN01070) and load the gel. The length of the amplified DNA fragments can be equalized with a suitable molecular weight standard (e. g. KBR311005). The separated DNA is colored by ethidium bromide or SybrGreen (5 µg/ ml) for 5 min and visualised under UV-light (312 nm).
- The PCR amplification leads for all bacteria to characteristic DNA fragments of specific length (**between 120 and 300 bp**) and for the 16S-DNA to a **489 bp** amplicon.
- The relative number of specific pathogen can be compared with the intensity of the 16S-DNA band. The presence and the quantity of each single pathogen species can be analysed.

DNA sequence	fragment length (bp):
bakterielle 16S-DNA	489
<i>Prevotella intermedia</i>	300
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	220
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	180
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	161
<i>Tannerella (bacteroides) forsythensis</i>	120

- In any case the negative controls must be negative for any amplification product. A very faint band of the 16S-RNA gene in the negative control can be due to the production process of TAQ-enzyme. Therefore its background and does not indicate a positive result for bacteria detection.
- The high amount of PCR cycles generates products in exponential area of amplification allowing a conclusion of density of pathogen organisms. An only faint DNA band characterises a normal colonisation whereas a more distinct DNA band indicates already abnormal growth. In consequence a very strong DNA band should be interpreted as result of a pathogen situation in the gingival pocket. The intensity of these DNA bands can also be measured by densitometric procedures.

11. Restrictions

The PCR results for all positive controls in DNA fragments of indicated length. For the samples at least the amplification of 16S-DNA fragment must be observed. If this is not the case, the samples must be tested a second time or the complete analysis must be repeated with freshly isolated DNA. If there are no positive control DNA fragments present, the amplification was incorrect and the chosen PCR conditions have to be proven/ corrected.