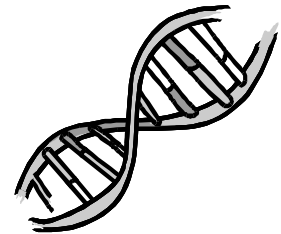


MutaPLATE[®] Mycobacterium tuberculosis *real time* PCR Kit



Qualitativer Test für den spezifischen Nachweis von Mycobacterium tuberculosis in offenen (z. B. Mikrotiterplattenformat) *real time* PCR - Systemen (z. B. Applied Biosystems, Stratagene).

REF KV1935196 



Nur zur in vitro Diagnostik



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
www.immundiagnostik.com
info@immundiagnostik.com

Tel.: +49 (0)6251/ 701900
Fax: +49 (0)6251/ 849430



1. VERWENDUNGSZWECK

Der **MutaPLATE® Mycobacterium tuberculosis** *real time* PCR Kit ist ein qualitativer Test zum spezifischen Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* (Komplex) in klinischen Proben mittels offenen *real time* PCR-Systemen (z. B. Applied Biosystems, Stratagene).

2. EINLEITUNG

Tuberkulose wird durch das *Mycobacterium tuberculosis* hervorgerufen, das 1882 der deutsche Bakteriologe Robert Koch (1841-1912) entdeckte. In seltenen Fällen kann es zu einer Tuberkulose-Infektion durch andere Mycobakterien kommen (z. B. durch *M. bovis* oder *M. africanum*).

Mit **MutaPLATE® Mycobacterium tuberculosis** werden alle Bakterien im MTC (Myco-bacterium Tuberculosis Complex) detektiert!

Tuberkulose ist weltweit ein öffentliches Gesundheitsproblem: Noch immer erkranken jährlich ca. 10 Millionen Menschen an Tuberkulose und täglich sterben etwa 4000 mit *Mycobacterium tuberculosis* infizierte Patienten. Schlüssel zur Tuberkulose-Kontrolle ist die schnelle Identifizierung infektiöser Personen. Die Diagnose basierte viele Jahre auf Kultivierung, welche bis zu mehreren Wochen dauern kann, bzw. auf Färbung säurefester Bazillen (acid-fast bacilli, AFB). Diese Nachweisbarkeit geht auf den Breslauer Dermatologen Albert Neisser (1855-1916) zurück; ein negatives Ergebnis schließt die Tuberkulose jedoch nicht vollends aus.

Die Bakterien des *Mycobacterium tuberculosis* - Komplex sind gram-positiv, säurefest und gegen Austrocknung/ Wärme widerstandsfähig. Im mikroskopischen Bild erscheint *Mycobacterium tuberculosis* als Stäbchen von 2 - 4 µm Länge und weist große Ähnlichkeiten zum *Mycobacterium leprae* auf. Das Material für die mikroskopische Untersuchung des Erregers wird von Körperflüssigkeiten/ Gewebebiopsien nach Fluorochrom- oder Ziehl-Neelsen Färbung gewonnen. Der Nachweis von Tuberkulosebakterien gelingt mit dieser Analysemethode erst bei Keimzahlen von 10^3 - 10^5 / ml Sputum.

Die molekulargenetische Untersuchung ist eine ideale Alternative für die bislang noch routinemäßig durchgeführte Mikroskopie/ Erregerflüssigkultur – vor allem verkürzt sie den Zeitraum der Untersuchung enorm und ist aufgrund der hohen Spezifität und Sensitivität die Methode der Wahl. Eine Reihe von Nukleinsäureamplifikations-Methoden wurde entwickelt und zur schnellen Detektion/ Identifikation des *Mycobacterium tuberculosis* Komplex (MTB) in klinischen Proben kommerzialisiert.

3. TESTPRINZIP

Der **MutaPLATE® Mycobacterium tuberculosis** *real time* PCR Kit enthält spezifische Primer, Sonden und weitere Reagenzien für die Detektion von *Mycobacterium tuberculosis* (12 *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (MTC) Bakterien: 7 *M. tuberculosis* - Stämme und 5 *M. bovis* - Stämme). Ausgangsmaterial für die DNA-Gewinnung des Erregers sind klinische Proben des Respirations- und Bronchialtrakts (z. B. Sputum, Lungenbiopsate, etc.).

Mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) unter Einsatz einer thermostabilen DNA-Polymerase wird das für *Mycobacterium tuberculosis* spezifische Genfragment amplifiziert.

Gleichzeitig wird die Spezifität des entstandenen Amplikons durch *real time* Hybridisierung mit für *Mycobacterium tuberculosis* - spezifischen Sonden überprüft (mit Fluorophor- und Quencher-Molekül markierte Oligonukleotide). Bei spezifischer *Mycobacterium tuberculosis*-Amplifikation wird das emittierte Fluoreszenzsignal von der optischen Einheit des *real time* PCR Mikrotiterplattensystems detektiert (ABI: PRISM SDS-, Stratagene: MxPRO-, Software).

Die *Mycobacterium tuberculosis* - spezifische Amplifikation wird mittels **FAM**-Fluoreszenz (470 nm Excision / 510 nm Detection) gemessen.

Zudem überprüft eine in jede Reaktion eingeschlossene interne Kontrolle, welche parallel zu den Proben koamplifiziert und detektiert wird, eine mögliche PCR-Inhibition. Die Detektion der amplifizierten internen Kontrolle wird mittels **VIC / HEX** - Fluoreszenz (530 nm Excision / 555 nm Detection) gemessen.

4. KITBESTANDTEILE

Jeder Testkit enthält Reagenzien zur Durchführung von 96 Bestimmungen, sowie eine Gebrauchsanleitung.

Bezeichnung	Reagenz	Konfektion	Deckelfarbe
A1	Amplifikations-Mix (gebrauchsfertig)	3 x 1,4 ml	blau
A2	Positivkontrolle	1 x 0,2 ml	rot
A3	Negativkontrolle	1 x 0,2 ml	grün

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

Benötigte Materialien - mitgeliefert:

- Reagenzien für die *real time* PCR in offenen Systemen (z.B. Mikrotiterplattenformat)
- Gebrauchsanweisung

Benötigte Materialien - nicht mitgeliefert:

- *real time* PCR-System (offen), z. B. Applied Biosystems oder vergleichbare Instrumente (z. B. von Stratagene)
- TC II - PCR-Reaktionsplatte, 96-well (Applied Biosystems) oder vergleichbare Mikrotiterplatten (bzw. PCR-Reaktionsgefäße, welche sich ebenfalls zur optischen Detektion in zum Applied Biosystem vergleichbaren Instrumenten eignen)
- Transparente Abdeckfolien für Mikrotiterplatten
- DNA-Extraktionskit für klinische Proben
- Pipetten (0,5 – 200 µl)
- sterile Filterspitzen für Mikropipetten

6. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

- Alle Reagenzien (A1 - A3) sollten **bis zum unmittelbaren Gebrauch bei <-20°C** gelagert werden.
- Ein mehrfaches Auftauen/ Einfrieren der Reagenzien A1 und A2 ist **unbedingt** zu vermeiden (bei Bedarf nach dem erstmaligem Auftauen geeignete Aliquots herstellen und die Reagenzien dann **sofort** wieder einfrieren).
- Während der PCR-Vorbereitung alle Arbeitsschritte **zügig** in einem Kryobehälter durchführen bzw. alle Reagenzien **stets geeignet kühlen**.
- Amplifikations-Mix (A1) **vor Lichtkontakt schützen**.
- Alle Reagenzien können bis zum Ablauf des (auf der Kit-Packung angegebenen) Mindesthaltbarkeitsdatum verwendet werden.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Dieser Test muss durch speziell geschultes Personal durchgeführt werden.
- Die klinischen Proben müssen als potentiell infektiöses Material angesehen und entsprechend auch entsorgt werden.
- Die Regeln der Good Laboratory Practice (GLP) müssen eingehalten werden.
- Testkit nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatum nicht mehr verwenden.

AMPLIFIKATION

Die PCR-Technologie ist sehr sensitiv, d. h. die Amplifikation eines einzelnen Moleküls generiert Millionen identischer Kopien. Diese Kopien können in Form von Aerosolen entweichen und sich auf Unterlagen festsetzen. Um eine Kontamination von Proben mit Amplifikaten aus vorausgegangenen Experimenten zu vermeiden, sollte in zwei (möglichst auch räumlich) von einander getrennten Bereichen gearbeitet werden und zwar:

- 1) Bereich, in dem die Proben vorbereitet und die Reagenzien angesetzt werden.
- 2) Bereich für die Amplifikation und deren Detektion.

Pipetten, Reaktionsgefäße und andere Arbeitsmittel sollten nicht innerhalb der verschiedenen Arbeitsbereiche zirkulieren.

- Sterile Pipettenspitzen mit Filtereinsatz benutzen.
- Für jeden Arbeitsplatz neue Handschuhe und Kittel benutzen.
- Dekontaminieren Sie in regelmäßigen Abständen Ihre Pipetten und Laborbänke mit Dekontaminationslösung.
- Vermeiden Sie Aerosolbildung.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Die gesamte Durchführung ist in folgende drei Schritte aufgeteilt:

- A) DNA-Extraktion.
- B) PCR und (kombinierte) Detektion der entstandenen DNA-Amplifikate mittels Primer und Hybridisierungs sonden.
- C) Interpretation der Ergebnisse mit Hilfe der Software des verwendeten (offenen) *real time* PCR-Systems (z. B. Applied Biosystems oder Stratagene).

A) DNA-EXTRAKTION

- 1) Die Extraktion bakterieller DNA wird mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen DNA-Isolierungs-Kits aus klinischen Proben durchgeführt und erfolgt entsprechend den Angaben des Herstellers.
- 2) Falls die *real time* PCR nicht sofort durchgeführt wird, sollten die extrahierten DNA-Proben bei $<-20^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden.

B) *REAL TIME* Mycobacterium tuberculosis (MutaPLATE®) PCR PROTOKOLL

Es ist ratsam, das gesamte Protokoll zu lesen, bevor mit der Durchführung begonnen wird.

Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen!

- 1) **40 µl** des gebrauchsfertigen Amplifikations-Mix (A1) mit einer Mikropipette und sterilen Filterspitzen in jede der benötigten Vertiefung der 96er-Mikrotiterplatte vorlegen.
- 2) **10 µl** der Proben-DNA bzw. der Positiv- und Negativkontrollen (A2 und A3) zu den zu den jeweiligen Vertiefungen zupipettieren und durch auf- und abpipettieren mischen (es empfiehlt sich zuerst die Negativ-Kontrolle zu pipettieren und diese unverzüglich mit Abdeckfolie zu verschließen, um Kontaminationen zu vermeiden).

Die 96er-Mikrotiterplatte mit der transparenten Abdeckfolie abkleben und in das *real time* PCR – Mikrotiterplattensystem überführen.

- 3) Folgendes *real time* PCR - Protokoll durchführen:

95°C für 10 min

40 Zyklen:

95°C für 20 sec

55°C für 60 sec

72°C für 20 sec

Messung am Schrittcende

*Messung am Schrittcende (für ABI 7000 –Instrument hier **30 sec** wählen!)*
(Fluoreszenzemissionsdaten beider Schritte werden zusammengeführt)

C) PCR ANALYSE UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

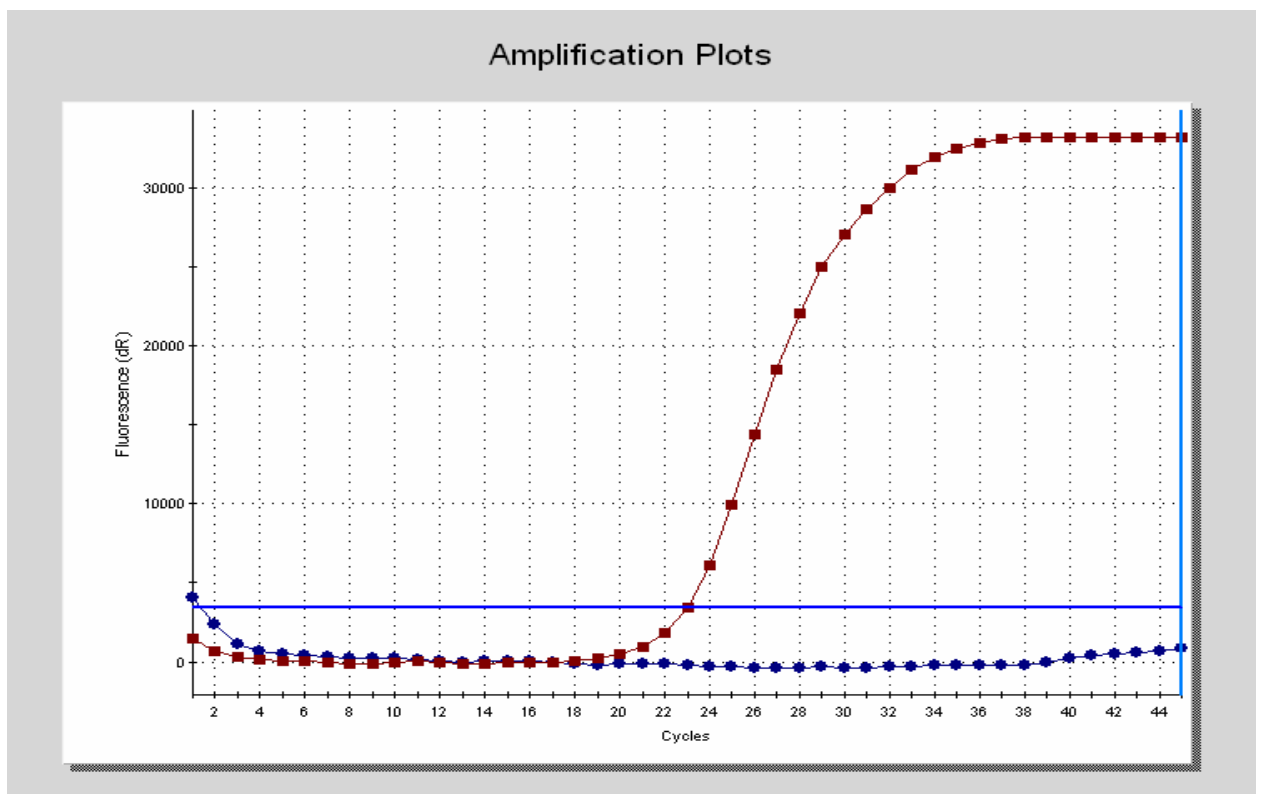
Mycobacterium tuberculosis - spezifische Amplifikation wird mittels FAM – Fluoreszenz (bei 510 nm) detektiert. Die interne Kontrolle wird mittels VIC / HEX- Fluoreszenz (bei 555 nm) gemessen.

Folgende Einstellung sollten für die Bestimmung von Reporter- und Quencher-Molekülen mit ABI PRISM SDS-Software (bzw. der Software vergleichbarer Instrumente) gewählt werden:

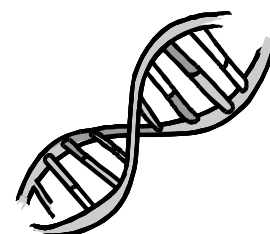
Detection	Reporter	Quencher
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> DNA	FAM	none
Interne Kontrolle	VIC / HEX	none

Folgende Resultate sind möglich:

- 1) FAM-Fluoreszenz wird detektiert.
Das Ergebnis ist positiv: die Probe enthält *Mycobacterium tuberculosis*-DNA.
In diesem Fall ist die Detektion der VIC / HEX - Fluoreszenz nicht notwendig, da hohe *Mycobacterium tuberculosis*-DNA - Konzentrationen zu einem verminderten bzw. fehlenden Fluoreszenzsignal der internen Kontrolle führen kann (Kompetition).
- 2) Es wird keine FAM-Fluoreszenz detektiert, jedoch eine VIC / HEX - Fluoreszenz (Signal der internen Kontrolle).
Die Probe enthält keine *Mycobacterium tuberculosis*- DNA.
Das detektierte Signal der internen Kontrolle schließt die Möglichkeit einer PCR-Inhibition aus.
- 3) Weder FAM-, noch VIC / HEX - Fluoreszenz wird detektiert.
Es kann keine diagnostische Aussage gemacht werden.
Die PCR-Reaktion wurde inhibiert.



MutaPLATE[®] Mycobacterium tuberculosis *real time PCR Kit*



Qualitative assay for the specific detection of Mycobacterium tuberculosis (complex) using open (e. g. microtiterplate) *real time* PCR systems (e. g. Applied Biosystems or Stratagene).

REF KV1935196 



-20°C

For in vitro diagnostic use only



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
www.immundiagnostik.com
info@immundiagnostik.com

Tel.: +49 (0)6251/ 701900

Fax: +49 (0)6251/ 849430



1. INTENDED USE

The **MutaPLATE® Mycobacterium tuberculosis** *real time* PCR kit is a qualitative screening assay for specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* (complex) in clinical specimens (gut biopsies, stool samples) using open *real time* PCR systems (e. g. Applied Biosystems, Stratagene).

2. INTRODUCTION

Tuberculosis is – along with AIDS and Malaria – the most widely spread infectious disease worldwide. The World Health Organization (WHO) estimated that a third of the world's population is infected and tuberculosis accounts for three million deaths annually. One-fifth of all deaths in adults in developing countries relate to TB. Two-thirds of the world's tuberculosis-infected people reside in Asia and this will have a significant impact on the control of TB in other countries as a result of increased immigration.

TB is caused by the tubercle bacillus *Mycobacterium tuberculosis* and rarely by *M. bovis* or *M. africanum*. The initial pulmonary infection usually goes unnoticed with lesions healing, sometimes leaving traces of calcified scar tissue. The infection may however progress to pulmonary tuberculosis, or through blood or lymphatic spread produce military, meningeal or other extrapulmonary involvement.

The key to interrupting the chain of transmission is the early diagnosis and treatment of pulmonary TB. For many years, diagnosis was based on staining smears for acid-fast bacilli (AFB) and culturing for mycobacteria. More recently, a number of nucleic acid amplification methods have been developed and made commercially available for rapid detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB) in clinical specimens.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The **MutaPLATE® Mycobacterium tuberculosis** *real time* PCR kit contains specific primers, hybridisation probes and additional material for the detection of all bacteria from *Mycobacterium tuberculosis* complex. Starting material for DNA extraction are clinical samples from the respiratory or bronchial tract (e. g. sputum, lung biopsy).

The amplification of a gene fragment specific for *Mycobacterium tuberculosis* during PCR (polymerase chain reaction) process is done by the use of thermostable DNA polymerase.

In the same step the specificity of the generated amplicon is proofed by hybridisation with probes (with fluorophor and quencher labelled oligonucleotides) specific for *Mycobacterium tuberculosis* (real time PCR).

In case of *Mycobacterium tuberculosis* specific amplification, the emitted fluorescence signal is detected and quantified by the *real time* PCR microplate system's optical unit (ABI: PRISM SDS-, Stratagene: MxPRO-Software).

Mycobacterium tuberculosis specific amplification is measured by **FAM** fluorescence (470 nm excision/ 510 nm detection).

To exclude a possible PCR inhibition, the amplification mix contains an internal control. The amplification of this internal control does not affect the *Mycobacterium tuberculosis* detection and is measured by a probe's **VIC / HEX** fluorescence (530 nm excision/ 555 nm detection).

4. KIT CONTENT

Each kit contains enough reagents to perform 96 tests. Each kit also contains a package insert.

Reference	Type of reagent	Presentation	Cap color
A1	amplification Mix (ready to use)	3 x 1,4 ml	blau
A2	positive control	1 x 0,2 ml	rot
A3	negative control	1 x 0,2 ml	grün

5. TEST PERFORMANCE

Required materials - provided:

- Reagents for the real time PCR in open system (e. g. microtiter plate formate)
- Package insert

Required materials - not provided:

- Open *real time* PCR system, e. g. Applied Biosystems or a comparable instrument (e.g. from Stratagene)
- TC II - PCR reaction plate, 96 wells (Applied Biosystems) or comparable microtiter plates (respectively reaction tubes to be used for optical detection within the two-parts holding frame, Applied Biosystems)
- Optical adhesive covers for microtiter plates
- DNA extraction kit for clinical samples
- Pipets (0.5 µl – 200 µl)
- sterile filter tips

6. STORAGE AND HANDLING

- All reagents (A1 to A3) should be stored at -20°C.
- Do not freeze and thaw the reagents A1, A2 several times. If used sporadically, prepare suited aliquots of the reagents and freeze again immediately.
- Cool all reagents during the working steps.
- Protect amplification mix (A1) from light (storage in the dark).
- All reagents can be used until the expiration date printed on the labels.

7. WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- This assay needs to be carried out by skilled personnel.
- Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials.
- This assay needs to be run according to GLP (Good Laboratory Practice).
- Do not use the kit after its expiration date.

AMPLIFICATION

The PCR technology is utmost sensitive. Thus, amplification of a single molecule generates millions of identical copies. These copies may evade through aerosols and sit on surfaces. In order to avoid contamination of samples with DNA which previously was amplified, it is important to physically strictly divide sample and reagent preparation units from sample amplification units. Set up two separate working areas:

- 1) Isolation of the DNA
- 2) Amplification/ detection of amplification products

Pipets, vials and other working materials should not circulate among working units!

- Use always sterile pipette tips with filters
- Wear separate coats and gloves in each area
- Routinely decontaminate your pipettes and the laboratory benches with decontaminant
- Avoid aerosols

8. PROCEDURE

The complete procedure is separated in three steps:

- A) DNA extraction
- B) Amplification and combined detection of DNA fragments using the specific probes.
- C) Interpretation of the results using the ABI: PRISM SDS- (respectively the Stratagene: MxPRO-) software.

A) DNA-EXTRACTION

- 1) Extract bacterial DNA from clinical respiratory/ bronchial samples by use of a commercial DNA isolation kit (suited for throat swabs, sputum etc.) according to the manufacturer's instructions.
- 2) If (TaqMan) PCR is not performed immediately, store the extracted DNA at –20°C.

B) *Real time* Mycobacterium tuberculosis (MutaPLATE®) PCR-PROTOCOL

Please carefully read the manufacturer's instructions before starting the procedure!
Each assay should include a negative and positive control. Use filter tips for all pipetting:

- 1) Pipet **40 µl** of the *ready to use* amplification mix (A1) per well of a 96 wells optical microtiter plate. The number of wells used is calculated from the number of samples plus one positive and one negative control.
- 2) Add **10 µl** of sample DNA or positive or negative control (A2 and A3) per well, respectively. Mix by up and down pipetting. Pipet the negative control first. To avoid contamination, it is advisable to cover the wells containing the negative control with an adhesive seal while pipetting the positive control and sample DNA. Remove this adhesive seal after preparing all wells.

Cover the 96 wells optical microtiter plate with optical adhesive cover and transfer to the (open) *real time* PCR system.

- 3) Run the PCR using following temperature protocol:

95°C for **10 min**

40 cycles of:

95°C for **20 sec**

55°C for **60 sec**

72°C for **20 sec**

measurement at end of this step

measurement at end of this step

(for ABI7000 instrument choose here **30 sec** !)
(fluorescence emission data of both steps are combined)

C) PCR ANALYSIS AND INTERPRETATION OF RESULTS

Mycobacterium tuberculosis specific amplification is detected by FAM fluorescence (at 510 nm). The internal control is measured by VIC / HEX fluorescence (at 555 nm).

Use following settings to define a reporter and quencher with the ABI PRISM SDS (or comparable) software:

Detection	Reporter	Quencher
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> DNA	FAM	none
Internal Control	VIC / HEX	none

Following results can arise:

- 1) FAM fluorescence is detected.
The result is positive: The sample contains *Mycobacterium tuberculosis*.
The occurrence of VIC / HEX fluorescence is inessential as high concentrations of *Mycobacterium tuberculosis* DNA may reduce or even inhibit the amplification of the internal control.
- 2) No FAM, but VIC / HEX fluorescence is detected.
The result is negative: The sample does not contain *Mycobacterium tuberculosis*. The detected signal of the internal control excludes the possibility of an inhibition of the PCR.
- 3) Neither FAM, nor VIC / HEX fluorescence is detected.
A diagnostic statement can not be made.
An inhibition of the PCR reaction occurred.

