

GenoQuick® MTB

VER 1.0



Deutsch: S. 2-12

English: p. 13-23

Français : p. 24-34

Italiano: p. 35-45

Español: p. 46-56

Português: p. 57-67

GenoQuick® MTB Molekulargenetisches Schnelltestsystem zum Direktnachweis des *Mycobacterium tuberculosis*- Komplexes aus Patientenproben

Methodik

Der **GenoQuick® MTB**-Schnelltest erlaubt die molekulargenetische Identifizierung des *M. tuberculosis*-Komplexes direkt aus dekontaminiertem Patientenmaterial wie Sputum (Induktion oder Expektoration), Bronchialmaterial (Bronchiallavage oder Bronchialaspirate), Trachealsekret sowie Magensaft- und Urinproben.

Das Amplifikationsprodukt wird qualitativ auf einem Teststreifen nachgewiesen.

Die einzelsträngigen Amplifikate hybridisieren zunächst spezifisch mit im Primer-Nukleotid-Mix enthaltenen Sonden. Im nachfolgenden Schnelltest werden diese Komplexe selektiv an die Testbande gebunden und durch eine Gold-Markierung visualisiert.

Der **GenoQuick® MTB**-Schnelltest dient als Direktnachweis zur Beurteilung von Patienten mit Tuberkulose-Verdacht.

Der gesamte Testablauf unterteilt sich in folgende drei Phasen: (i) DNA-Isolierung aus dekontaminiertem Patientenmaterial (hierzu wird der **GenoLyse®**-Kit benötigt; s. Kapitel Bestellinformationen), (ii) Multiplex-Amplifikation mit unterschiedlich markierten Primern (eine hierzu benötigte thermostabile DNA-Polymerase ist nicht Bestandteil des Kits) mit nachfolgender Hybridisierung und (iii) Detektion auf dem Teststreifen.

Lagerung und Vorsichtsmaßnahmen

Primer-Nukleotid-Mix (PNM) streng getrennt von DNA-haltigen Produkten lagern. Zur kurzzeitigen Lagerung bis zu 4 Wochen bei 2-8°C, zur langfristigen Lagerung bei -20°C aufbewahren. Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden; gegebenenfalls den PNM aliquotieren. Alle weiteren Kitbestandteile bei 2-8°C lagern. Die Röhrchen mit den Teststreifen stets gut verschließen; die Beschichtung an der Röhrchenwandung enthält Trockenmittel. Das angegebene Haltbarkeitsdatum sollte nicht überschritten werden. Reagenzien aus Kits mit unterschiedlichen Chargen-Bezeichnungen sollten nicht miteinander gemischt werden.

Untersuchungsmaterial von Patienten, wie es für Laboratoriumsuntersuchungen eingesetzt wird, ist als potenziell infektiös einzustufen und entsprechend zu behandeln. Proben von Risikopatienten sollten immer gekennzeichnet und unter geeigneten Sicherheitsvorkehrungen bearbeitet werden. Darüber hinaus sind die jeweils geltenden Vorschriften zur Unfallverhütung, zum Umweltschutz und zum Umgang mit Gefahrstoffen einzuhalten. Insbesondere müssen stets geeignete Schutzkleidung und Schutzhandschuhe getragen werden.

Bei der Durchführung des Tests sind die für die Nukleinsäureamplifikation notwendigen Vorsichtsmaßnahmen zu beachten. Utensilien wie Pipettenspitzen, die mit den Reagenzien in Berührung kommen, müssen frei von DNAsen sein.

Qualitätssicherung

Zur Validierung der korrekten Testdurchführung und der Funktionalität der Kitbestandteile trägt jeder Teststreifen 2 Kontrollzonen:

- eine Konjugatkontrollzone, die eine erfolgreiche Konjugatbindung anzeigt
- eine Amplifikationskontrollzone, die eine erfolgreiche Amplifikationsreaktion anzeigt

DNA-Isolierung

Als Ausgangsmaterial für den Test können dekontaminierte Patientenmaterialien wie Sputum (Induktion oder Expektorat), Bronchialmaterial (Bronchiallavage oder Bronchialaspirat), Trachealsekret sowie Magensaft (nur von Erwachsenen) und Urinproben eingesetzt werden. Der Test eignet sich nicht für den routinemäßigen *M. tuberculosis*-Komplex-Nachweis aus Kulturmaterial. Die Proben sind unter Anwendung der NALC-NaOH-Methode gemäß den Empfehlungen der CDC-Veröffentlichung „Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory“ aufzubereiten. Der Arbeitsraum muss völlig frei von amplifizierter DNA sein.

Zur DNA-Isolierung wird der **GenoLyse**®-Kit (DNA-Isolierung mittels alkalischer Lyse; s. Kapitel Bestellinformationen) eingesetzt und nach der entsprechenden Anleitung abgearbeitet. Diese Methode wurde zur Validierung des **GenoQuick**® **MTB**-Kits eingesetzt. Soll eine alternative Isolierungsmethode angewendet werden, muss diese zunächst durch den Anwender auf ihre Eignung für dieses Testsystem überprüft werden.

Amplifikation

Den Amplifikations-Mix (45 µl) in einem Raum herstellen, der garantiert frei von DNA ist. Aus Gründen des Kontaminationsschutzes sollte die zu amplifizierende DNA in einem abgetrennten Bereich zugegeben werden. **Benutzen Sie ausschließlich eine „Hot Start“ DNA-Polymerase.**

Pro Probe werden benötigt:

- 35 µl PNM – im Kit enthalten
- 5 µl 10-fach Polymerase-Puffer – nicht im Kit enthalten
- x µl $MgCl_2$ -Lösung¹⁾ – nicht im Kit enthalten
- 1-2 Unit(s) thermostabile DNA-Polymerase (Angaben des Herstellers beachten)
– nicht im Kit enthalten
- y µl Wasser zum Auffüllen auf 45 µl (ohne Berücksichtigung des Enzymvolumens)
– nicht im Kit enthalten
- 5 µl DNA-Lösung zugeben. Dies ergibt ein Endvolumen von 50 µl (ohne Berücksichtigung des Enzymvolumens).

¹⁾ Je nach eingesetztem Enzym/Puffersystem liegt die optimale $MgCl_2$ -Endkonzentration zwischen 1,5 und 4 mM. Beachten Sie, dass manche 10-fach Polymerase-Puffer bereits $MgCl_2$ enthalten.

Die Leistungsbewertungsprüfung des **GenoQuick® MTB**-Assays erfolgte mit der HotStarTaq DNA-Polymerase der Fa. Qiagen. Bei Verwendung dieses Enzyms werden pro Probe benötigt:

- 35 µl PNM – im Kit enthalten
- 5 µl 10x PCR Buffer für HotStarTaq (enthält 15 mM $MgCl_2$) – nicht im Kit enthalten
- 5 µl 25 mM $MgCl_2$ -Lösung – nicht im Kit enthalten
- 0,2 µl (1 U) HotStarTaq – nicht im Kit enthalten
- 5 µl DNA-Lösung (in getrenntem Bereich zugeben)

Die Endkonzentration an $MgCl_2$ in diesem Amplifikationsansatz beträgt 4 mM.

Berechnen Sie die Anzahl der zu amplifizierenden Proben. Diese ergibt sich aus der Zahl der zu untersuchenden Proben zuzüglich der Zahl der gewünschten Kontrollproben. Einer Kontaminationskontrolle z.B. wird statt DNA-Lösung 5 µl Wasser zugesetzt. Erstellen Sie einen Master-Mix, der bis auf die DNA-Lösungen sämtliche zur Amplifikation benötigten Reagenzien enthält, und mischen Sie gut (nicht vortexten). Aliquotieren Sie den Mix zu je 45 µl in vorbereitete PCR-Reaktionsgefäße.

Programmierungsprotokoll für Thermocycler²⁾:

15 min 95°C 1 Zyklus

30 sec 95°C	} 40 Zyklen
40 sec 55°C	
30 sec 72°C	

2 min 95°C 1 Zyklus

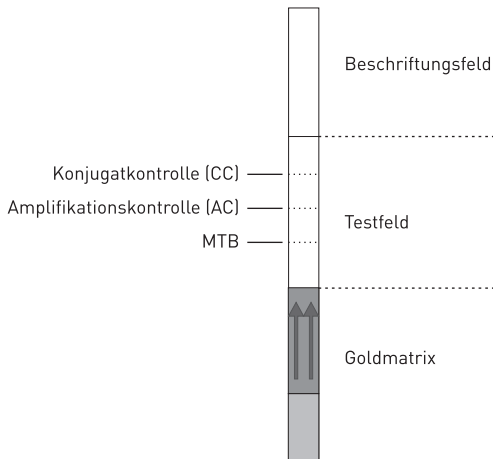
5 min 20°C 1 Zyklus

(∞ 8°C)

²⁾ Gilt für die bei der Validierung verwendete Taq-Polymerase. Bei anderen „Hot Start“ DNA-Polymerasen muss der erste Schritt eventuell verkürzt werden (Herstellerangaben beachten).

Amplifikationsprodukte können bei +8 bis -20°C gelagert werden. Es ist jedoch zu beachten, dass der Hybrid-Komplex nur begrenzt stabil ist. Bei einer Pause zwischen Amplifikation und Detektion von mehr als 30 min bei Raumtemperatur (15-25°C) bzw. 1 Tag bei +8 bis -20°C müssen deshalb die Hybridisierungsschritte des Thermocyclerprogramms (2 min 95°C, 5 min 20°C) noch einmal durchgeführt werden.

Detektion



Hinweis: Der Teststreifen entspricht nicht der Originalgröße.

Vorbereitung

Für jede Probe unmittelbar vor der Detektion einen Teststreifen aus dem Streifenröhrchen nehmen und mit einem Bleistift auf dem weißen Beschriftungsfeld (s.o.) kennzeichnen. Der Streifen ist fast vollständig mit einer transparenten Folie überzogen und kann daher im Bereich des Beschriftungsfelds gefahrlos berührt werden. Für jede Probe in ein Röhrchen der mitgelieferten Laufstation 100 µl Laufpuffer (RB) pipettieren.

- 1. Je 10 µl hybridisiertes Amplifikat in ein Röhrchen mit 100 µl RB geben und durch Auf- und Abpipettieren gut mischen.**

Der Laufpuffer färbt sich nach Zugabe des Amplifikats blassgelb.

- 2. Teststreifen mit der Gold-Matrix nach unten (Pfeile weisen nach oben) in das zugehörige Röhrchen stellen und ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.**

Positive Ergebnisse können vor Ablauf der Inkubationszeit sichtbar werden. Trotzdem sollte die angegebene Zeitspanne eingehalten werden. Eine Überschreitung der angegebenen Inkubationszeit kann dazu führen, dass sich die Signalintensitäten verändern.

3. Teststreifen aus den Röhrchen nehmen, Ergebnisse ablesen und auf dem mitgelieferten Auswertungsbogen notieren (s. Kapitel Auswertung und Interpretation der Ergebnisse); Teststreifen verwerfen.

Aufbewahrte Teststreifen stellen eine Kontaminationsquelle dar; zudem können sich die Signalintensitäten durch Trocknung des Streifens verändern. Daher sollten die Streifen nach dem Ablesen verworfen oder digital archiviert werden.

Nach erfolgter Abarbeitung Teststreifen und Röhrchen mit restlichem Laufpuffer in Abfallgefäß mit frisch verdünnter 1,5%iger Natriumhypochlorit-Lösung geben und Handschuhe verwerfen. Arbeitsfläche mit frisch verdünnter 1,5%iger Natriumhypochlorit-Lösung reinigen und anschließend mit Wasser nachwischen.

Auswertung und Interpretation der Ergebnisse

Ein Auswertungsbogen liegt dem Kit bei.

Konjugatkontrolle (CC)

Diese Reaktionszone dokumentiert die Effizienz der Konjugatbindung sowie den korrekten Durchlauf des Teststreifens und muss immer entwickelt sein.

Amplifikationskontrolle (AC)

Das bei korrekter Durchführung während der Amplifikation entstehende Kontrollprodukt bindet an die Amplifikationskontrollzone. Ist die Bande entwickelt, kann das Vorhandensein von Hemmstoffen sowie Fehler bei Ansatz und Durchführung der Amplifikationsreaktion ausgeschlossen werden.

Bei einem positiven Testergebnis kann das Signal der Amplifikationskontrollbande aufgrund von Kompetitionreaktionen während der Amplifikation oder dem Vorhandensein einer begrenzten Menge an Hemmstoffen abgeschwächt sein und unter Umständen sogar ganz wegfallen. Der Test ist in diesem Falle jedoch ordnungsgemäß durchgeführt worden und eine Wiederholung nicht erforderlich.

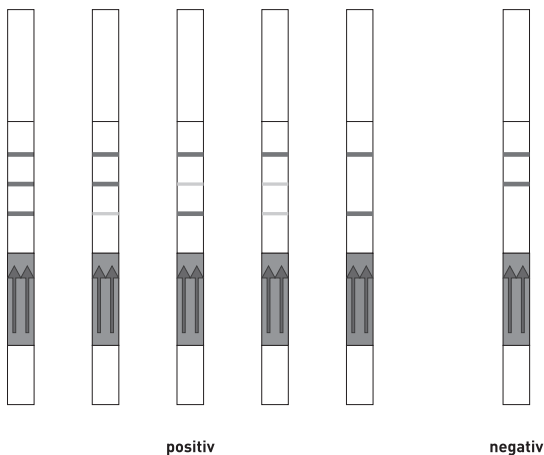
Bei einem negativen Testergebnis sollte die Intensität der AC ungefähr so stark wie die des Kontaminationskontrollansatzes sein. Eine schwache oder fehlende Ampli-

fikationskontrolle bei einem negativen Testergebnis ist ein Hinweis auf Fehler bei Ansatz und/oder Durchführung der Amplifikationsreaktion, das Vorhandensein von Hemmstoffen oder eine Überladung des Testsystems (s. Kapitel Troubleshooting). Das Testergebnis ist dann als nicht valide zu werten und die entsprechende Probe muss wiederholt werden.

***Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (MTB)**

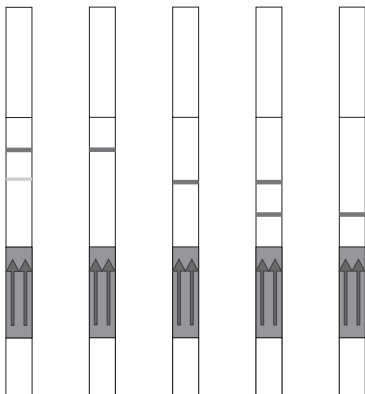
Ist diese Reaktionszone entwickelt, dokumentiert sie das Vorhandensein eines Mitglieds des *M. tuberculosis*-Komplexes. Die Signalintensität dieser Bande kann in Abhängigkeit von der Zellzahl in der Patientenprobe unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Treten sehr schwache Signale auf, sollte die entsprechende Probe wiederholt werden.

In der folgenden Grafik sind mögliche valide Bandenmuster dargestellt:



Hinweis: Die hier gezeigten Bandenintensitäten verstehen sich nicht als absolute Bezugsgröße zur Bewertung einzelner Testergebnisse, sondern dienen lediglich zur Andeutung der möglichen Bandbreite der Signalstärken.

In der folgenden Grafik sind mögliche nicht-valide Bandenmuster dargestellt:



nicht valide

Hinweis: Die hier gezeigten Bandenintensitäten verstehen sich nicht als absolute Bezugsgröße zur Bewertung einzelner Testergebnisse, sondern dienen lediglich zur Andeutung der möglichen Bandbreite der Signalstärken

Grenzen der Methode

Der Test wurde für die Verwendung von dekontaminiertem Direktmaterial validiert. Getestete Direktmaterialien sind Sputum (Induktion oder Expektoration), Bronchialmaterial (Bronchiallavage oder Bronchialaspirate), Trachealsekret sowie Magensaft (nur von Erwachsenen) und Urinproben. Der Anwender ist für die Feststellung der Eignung des Assays für andere Probenmaterialien selbst verantwortlich. Ein DNA-Nachweis wie das vorliegende Testsystem detektiert sowohl DNA von lebenden wie auch von nicht-lebenden Bakterien. Der **GenoQuick® MTB**-Test ist daher nicht als Verlaufs- oder Erfolgskontrolle einer antimikrobiellen Behandlung geeignet.

Der Einsatz zu hoher DNA-Konzentrationen kann zu einer Überladung des Testsystems führen, daher ist dieser Test nicht für den routinemäßigen Mykobakterien-Nachweis aus Kulturen geeignet.

Der **GenoQuick® MTB**-Test liefert qualitative Ergebnisse. Die Intensität der Sondenanfärbung der MTB-Bande erlaubt keinen Aufschluss über die Zahl der Zellen in einer positiven Probe. Ein negatives Ergebnis schließt die Möglichkeit nicht aus, dass die vorhandene Konzentration des Ziel-Organismus unterhalb der Nachweisgrenze des Tests liegt.

Wie bei anderen diagnostischen Tests müssen die Ergebnisse dieses Direktnachweises im Zusammenhang mit anderen dem behandelnden Arzt zur Verfügung stehenden Labordaten und klinischen Befunden interpretiert werden.

Vor der Amplifikation muss bakterielle DNA aus Probenmaterial mithilfe des **GenoLyse®**-Kits extrahiert werden (s. Kapitel DNA-Isolierung u. Bestellinformationen). Es muss gewährleistet sein, dass es während der Amplifikation zu einer effizienten Vervielfältigung der Ausgangs-DNA kommt.

Dieser Test und die daraus resultierende Aussage beziehen sich ausschließlich auf die Genomabschnitte, aus denen die spezifischen Primer und Sonden ausgewählt wurden. Eine eventuelle Sequenzanalyse bleibt weiterführenden Untersuchungen vorbehalten. Wie bei jedem Nachweissystem auf Hybridisierungs-Basis besteht auch beim vorliegenden Testsystem die Möglichkeit, dass Sequenzvariationen in den Genombereichen, aus denen die Primer und Sonden gewählt wurden, für deren Detektion der Test aber nicht konzipiert ist, zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Aufgrund der hohen Variabilität von Bakteriengenomen ist es daher möglich, dass sehr selten auftretende Spezies-Varianten nicht erkannt werden. Der Test spiegelt den aktuellen Kenntnisstand der Firma Hain Lifescience wider.

Dieser Test ist nur von Fachpersonal durchzuführen, welches im Testverfahren geschult wurde und mit molekularbiologischen Techniken vertraut ist.

Die Leistungsbewertungsprüfung dieses Testsystems wurde mit der HotStarTaq DNA-Polymerase der Fa. Qiagen (Hilden) durchgeführt. Für die DNA-Isolierung wurde der **GenoLyse®**-Kit verwendet. Da der Test nicht für alle kommerziell erhältlichen Polymerasen bzw. DNA-Isolierungskits validiert werden konnte, muss die Eignung anderer als der hier erwähnten Polymerasen und Isolierungsmethoden vom Anwender selbst validiert werden.

Die Leistungsdaten des Assays können unter www.hain-lifescience.de angefragt werden.

Troubleshooting

Schwache oder gar keine Banden inkl. Konjugatkontrolle

- Zu wenig oder zu viel Laufpuffer in das Röhrchen gegeben.
- Zu viel Amplifikat in den Laufpuffer gegeben.
- Teststreifen nicht korrekt in den Laufpuffer getaucht.

Schwache oder keine Amplifikationskontrolle bei negativer MTB-Bande

- Amplifikat nicht denaturiert und hybridisiert. Hybridisierung wiederholen (s. Kapitel Amplifikation).
- Zwischen Hybridisierung und Detektion sind mehr als 30 min vergangen oder die Proben wurden in dieser Zeit über Raumtemperatur erwärmt. Hybridisierung wiederholen (s. Kapitel Amplifikation).
- Kein oder zu wenig Amplifikat in den Laufpuffer gegeben.
- Qualität der isolierten DNA lässt keine effiziente Amplifikation zu. DNA-Isolierung und Amplifikationsreaktion wiederholen; evtl. eine andere DNA-Isolierungsmethode einsetzen (s. Kapitel DNA-Isolierung).
- Überladung des Testsystems wegen Einsatz einer zu hohen DNA-Konzentration z.B. durch die Verwendung von nicht ausreichend verdünntem Kulturmaterial

Unerwartetes Ergebnis

- Kontamination der isolierten DNA oder der Amplifikationsreagenzien durch zuvor isolierte oder amplifizierte DNA. Bei einer Kontamination der Amplifikationsreagenzien zeigt auch eine mitgeführte Kontaminationskontrolle ein entsprechendes Bandenmuster.
- Kontamination benachbarter Röhrchen während der Amplifikatzugabe.
- Keine oder zu wenig DNA in die Amplifikationsreaktion gegeben, da z.B. keine oder zu wenig Zellen im Direktmaterial vorlagen.
- Beim Isolat handelt es sich um eine bakterielle Spezies, die mit dem vorliegenden Test nicht nachgewiesen werden kann.

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

- Einmal-Handschuhe
- **GenoLyse**[®]-Kit (s. Kapitel Bestellinformationen)
- Natriumhypochlorit-Lösung (haushaltsübliche Chlorbleiche ohne Geruchs- und Farbstoffe)
- PCR-Reaktionsgefäße, DNase- und RNase-frei
- Pipetten (variabel im Bereich bis 10, 20, 200 und 1000 µl)
- Sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Thermocycler (Heizrate: 3°C/sec, Kühlrate: 2°C/sec, Regelgenauigkeit: +/-0,2°C)
- Thermostabile DNA-Polymerase inkl. Puffer (Empfehlung: „Hot Start“-Enzym, Extensionsrate: 2-4 kb/min bei 72°C, Halbwertszeit: 10 min bei 97°C, 60 min bei 94°C, Amplifikationseffizienz: >10⁵-fach)
- Wasser (*molecular biology grade*)
- Zeitmesser

Bestandteile des Kits

	12	96
Teststreifen beschichtet mit spezifischen Sonden (DS GQ MTB)	12	96
Primer-Nukleotid-Mix (PNM GQ MTB) enthält spezifische Oligonukleotide, Nukleotide, Farbstoff	0,5 ml	4 ml
Laufpuffer (RB) gebrauchsfertig enthält Puffersubstanz, <1% NaCl, <1% anionisches Tensid	2 ml	16 ml
Laufstation mit 96 Röhrchen, Arbeitsanleitung	je 1	je 1
Auswertungsbogen	1	4

Bestellinformationen

GenoLyse[®] DNA-Isolierungskit für 96 Proben

Art.-Nr.: 51610

GenoQuick® MTB

Rapid Molecular Genetic Assay for the Direct Detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex from Patient Specimens

Methodology

The **GenoQuick® MTB** test permits the fast molecular genetic identification of the *M. tuberculosis* complex directly from decontaminated patient specimens like sputum (induction or expectoration), bronchial material (bronchoalveolar lavages and bronchial aspirates), tracheal secretion, gastric juice, and urine. The amplification product is qualitatively detected on a dipstick. First, the single stranded amplicons hybridize with specific probes included in the Primer Nucleotide Mix. These complexes then selectively bind to the test band on the dipstick and are visualized by a gold labeling. The **GenoQuick® MTB** assay is a direct test for a screening of patients with a possible tuberculosis infection.

The whole procedure is divided into three steps: (i) DNA extraction from decontaminated patient specimens (the necessary **GenoLyse®** kit is not provided; see chapter Ordering Information), (ii) multiplex amplification with differently labeled primers (the necessary thermostable DNA polymerase is not provided) with subsequent hybridization, and (iii) detection on the dipstick.

Storage and Precautions

Store Primer Nucleotide Mix (PNM) and Positive Control DNA (C+ GQ MTB) at 2-8°C upon arrival isolated from any potential source of contaminating DNA. If longer storage (more than 4 weeks) is required, store at -20°C. In order to avoid repeated freezing and thawing, aliquot PNM. Store all other kit components at 2-8°C. Close tube with dipsticks properly after each use; the inner tube wall is coated with desiccant. Do not use the reagents beyond their expiry date. Do not mix reagents from kits with different lot numbers.

Patient specimens must always be considered as potentially infectious. Samples from risk patients must always be labeled and handled under suitable safety conditions. Observe all federal, state, and local safety and environmental regulations. Always wear suitable protective clothing and gloves.

Observe the usual precautions for amplification set-up. It is essential that all reagents and materials used for DNA extraction and amplification set-up are free from DNases.

Quality Control

In order to validate the correct performance of the test and the proper functioning of kit components, each dipstick includes 2 control zones:

- a Conjugate Control zone to check the binding of the conjugate on the dipstick
- an Amplification Control zone to check for a successful amplification reaction

DNA Extraction

Decontaminated patient specimens like sputum (induction or expectoration), bronchial material (bronchoalveolar lavages and bronchial aspirates), tracheal secretion, gastric juice (from adults only), and urine are used as starting material for DNA extraction. The assay must not be used as a standard method for detection of *M. tuberculosis* complex from cultured material. Samples must be processed using the NALC/NaOH method according to the CDC publication "Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory". The working area must be free from amplified DNA.

For DNA extraction the **GenoLyse**[®] kit (DNA extraction via alkaline lysis; see chapter Ordering Information) is used and processed as described in the respective manual. The performance evaluation of the **GenoQuick**[®] **MTB** kit was carried out using the method described above. The user is in charge of testing the applicability of any alternative extraction method with this assay.

Amplification

Prepare the amplification mix (45 µl) in a DNA-free room. The DNA sample should be added in a separate area. **It is crucial to use a hot start DNA polymerase.**

Per tube mix:

- 35 µl PNM – provided
- 5 µl 10x polymerase incubation buffer – not provided
- x µl MgCl₂ solution¹¹ – not provided
- 1-2 unit(s) thermostable DNA polymerase (refer to manual) – not provided
- y µl water to obtain a volume of 45 µl (not considering volume of enzyme) – not provided
- Add 5 µl DNA solution leading to a final volume of 50 µl (not considering volume of enzyme).

¹¹ Depending on the enzyme/buffer system used, the optimal MgCl₂ concentration may vary between 1.5 and 4 mM. Please note that some incubation buffers already contain MgCl₂.

The performance evaluation of the **GenoQuick® MTB** assay was carried out using the HotStarTaq DNA Polymerase from Qiagen. When using this enzyme, the following amounts are required per sample:

- 35 µl PNM – provided
- 5 µl 10x PCR Buffer for HotStarTaq (contains 15 mM MgCl₂) – not provided
- 5 µl 25 mM MgCl₂ solution – not provided
- 0.2 µl (1 U) HotStarTaq – not provided
- 5 µl DNA solution (add in a separated area)

The final MgCl₂ concentration in this amplification mix is 4 mM.

Determine the number of samples to be amplified (number of samples to be analyzed plus control samples). A contamination control sample contains 5 µl of water instead of DNA solution. Prepare a master mix containing all reagents except for DNA solution and mix well (do not vortex). Aliquot 45 µl in each of the prepared PCR tubes.

Amplification profile²⁾:

15 min 95°C 1 cycle

30 sec 95°C	}	40 cycles
40 sec 55°C		
30 sec 72°C		

2 min 95°C 1 cycle

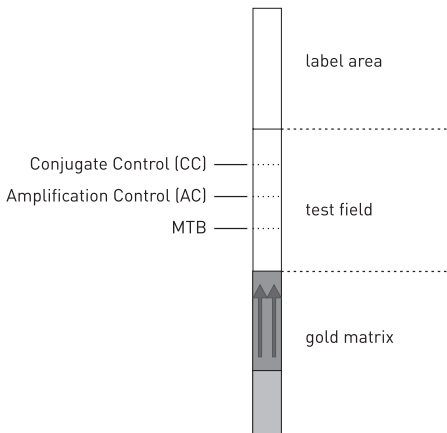
5 min 20°C 1 cycle

(∞ 8°C)

²⁾ Applies to the Taq polymerase used for validation. When using other hot start DNA polymerases, the time interval of the first step might have to be reduced (please refer to manual of the enzyme).

Amplification products can be stored at +8 to -20°C. Please note, however, that the hybridization product has only a limited stability. Therefore, repeat the hybridization steps of the cycler program (2 min 95°C, 5 min 20°C) if the time interval between amplification and detection exceeds 30 min at room temperature (15-25°C) and 1 d at +8 to -20°C, respectively.

Detection



Note: The dipstick is not displayed in original size.

Preparation

Directly before starting the detection, remove one dipstick from the dipstick tube for each sample and mark it with a pencil in the white label area. The dipstick is almost completely covered with a transparent foil and can therefore be touched at the label area. For each sample, pipette 100 μ l Running Buffer (RB) in a tube of the test rack provided.

- 1. Add 10 μ l hybridized amplicon to a tube filled with 100 μ l RB and pipette up and down to mix well.**

The color of the RB will change to pale yellow after adding the amplicon.

- 2. Place dipstick with the gold matrix facing downwards (arrows pointing upwards) in the respective tube and incubate for 10 minutes at room temperature.**

Positive results may be detected earlier; still, the indicated time should be observed. An extended incubation time, on the other hand, may lead to a change in signal intensity.

3. Remove dipsticks from tubes to read and note down results on the evaluation sheet provided (see chapter Evaluation and Interpretation of Results) and discard dipsticks.

Preserving dipsticks bears a contamination risk; additionally, the drying process may cause changes in signal intensities. Hence, after documenting the results, the developed dipsticks should be discarded or archived digitally.

Dispose of dipsticks and tubes with remaining buffer in a container with freshly prepared 1.5% sodium hypochlorite solution and discard gloves. Treat working area with a freshly prepared 1.5% sodium hypochlorite solution and rinse with water.

Evaluation and Interpretation of Results

An evaluation sheet is provided with the kit.

Conjugate Control (CC)

A line must develop in this zone, documenting the efficiency of conjugate binding and proper flow of the dipstick.

Amplification Control (AC)

When the test is performed correctly, a control amplicon will bind to the Amplification Control zone on the dipstick. If this band is developed, the carry-over of amplification inhibitors and mistakes during setup and performance of the amplification reaction can be excluded.

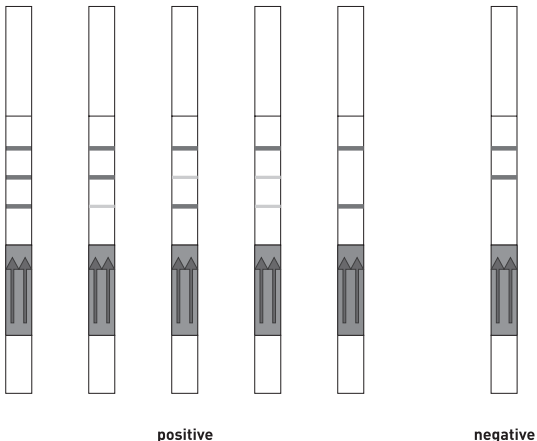
In case of a positive test result, the signal of the Amplification Control zone can be weak or even vanish totally. This might be due to competition of the single reactions during amplification or the presence of a limited amount of amplification inhibitors. In this case, however, the amplification reaction was performed correctly and the test does not have to be repeated.

In case of a negative test result, the intensity of the AC should be about as strong as the AC of the contamination control sample. A weak or missing AC band in case of a negative test result indicates mistakes during amplification set-up, carry-over of amplification inhibitors, or inhibition due to overload of the test system (see chapter Troubleshooting). In this case, the test result is not valid and the respective sample has to be repeated.

***Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB)**

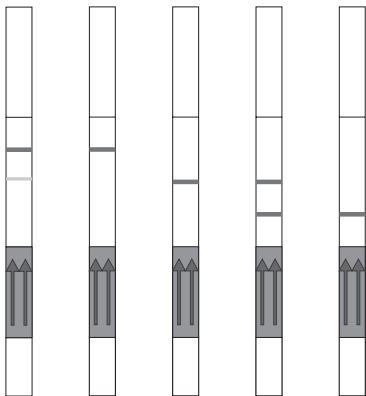
This reaction zone documents the presence of a member of the *M. tuberculosis* complex. The intensity of this band varies depending on the number of cells in the patient sample. In case of a very weak signal, the respective sample should be repeated.

The figure below shows possible valid banding patterns:



Note: The band intensities displayed in the figures above do not provide reference signal strengths for evaluation of test results, but intend to give an impression of the possible variety of band intensities.

The figure below shows possible banding patterns representing invalid results:



not valid

Note: The band intensities displayed in the figures above do not provide reference signal strengths for evaluation of test results, but intend to give an impression of the possible variety of band intensities.

Limitations

The test was validated for usage of decontaminated direct patient material. Clinical specimens tested are sputum (induction or expectoration), bronchial material (bronchoalveolar lavages and bronchial aspirates), tracheal secretion, gastric juice (from adults only), and urine. The user is in charge of validating the applicability of this assay for other sample materials.

As any DNA detection method the test system on hand detects DNA from viable and non-viable bacteria. Therefore, the **GenoQuick® MTB** test may not be used for monitoring the progression or success of treatment of patients with antimicrobial therapy.

Application of exceeded DNA concentrations may lead to inhibition of PCR or detection; therefore, the test must not be used as standard method for examining *Mycobacterium* cultures.

The **GenoQuick® MTB** test generates qualitative results. The intensity of the MTB band on a dipstick does not give information about the number of cells in a sample. A negative test result does not exclude the possibility that the concentration of the target organism lies beyond the detection limit of the assay. As with other diagnostic assays, the results of this direct test may only be interpreted in combination with additional laboratory and clinical data available to the responsible physician.

Prior to amplification, bacterial DNA has to be extracted using the **GenoLyse®** kit (see chapters DNA Extraction and Ordering Information). It must be ensured that the template DNA is efficiently amplified during the amplification reaction.

The test only works within the limits of the genomic regions the primers and probes were chosen from. Potential sequence analysis remains to further investigations. As with any detection system based on hybridization the test system on hand bears the possibility that sequence variations in the genomic regions the primers and probes were chosen from but the detection of which the test was not designed for may lead to false results. Due to the high variability of bacterial genomes it is possible that very rare species variations might not be detected. The test reflects the state of knowledge of Hain Lifescience.

Use of this assay is limited to qualified personnel well trained in the test procedure and familiar with molecular biological methods.

Performance evaluation of this assay was carried out using the HotStarTaq DNA Polymerase from Qiagen (Hilden, Germany). For DNA extraction the **GenoLyse®** kit was used. Since the performance characteristics of this assay have not been validated for all polymerases and DNA extraction kits commercially available, the user is in charge of validating the applicability of polymerases or extraction methods other than those mentioned above.

Performance data of the assay can be requested through:
www.hain-lifescience.com

Troubleshooting

Overall weak or no signals (including Conjugate Control zone)

- Too little or too much Running Buffer added to tube.
- Too much amplicon added to Running Buffer.
- Dipstick not correctly dipped into Running Buffer.

Weak or no Amplification Control with no MTB signal present

- Amplicon not denatured and hybridized. Repeat hybridization (see chapter Amplification).
- Time between denaturation and detection longer than 30 minutes or samples were warmed above room temperature. Repeat hybridization (see chapter Amplification).
- No or too little amount of amplicon added to Running Buffer.
- Quality of extracted DNA does not allow an efficient amplification. Repeat DNA extraction and amplification reaction; if necessary, try a different DNA extraction method (see chapter DNA Extraction).
- DNA concentration used for amplification too high e.g. due to the use of DNA from cultured material that has not been sufficiently diluted

Unexpected result

- Contamination of extracted DNA and/or amplification agents with extracted and/or amplified DNA. In case amplification agents are contaminated, a contamination control sample also shows the respective banding pattern.
- Contamination of neighboring tubes by spillage during addition of amplicon.
- No or too little DNA added to amplification reaction, e.g. due to no or too little cells in patient specimen.
- The bacterial species present in the sample can not be detected with this test.

Material Required but not Provided

- Adjustable pipettes for 10, 20, 200, and 1000 μ l
- Disposable gloves
- Disposable sterile pipette tips with filter
- **GenoLyse**[®] kit (see chapter Ordering Information)
- PCR tubes, DNase and RNase free
- Sodium hypochlorite solution (household bleach without dyes and scents)
- Thermal cycler (heating rate: 3°C/sec, cooling rate: 2°C/sec, precision: +/-0.2°C)
- Thermostable DNA polymerase with buffer (recommendation: hot start enzyme, extension rate: 2-4 kb/min at 72°C, half-life: 10 min at 97°C, 60 min at 94°C, amplification efficiency: >10⁵ fold)
- Timer
- Water (molecular biology grade)

Kit Contents

	12	96
Dipsticks coated with specific probes (DS GQ MTB)	12	96
Primer/Nucleotide Mix (PNM GQ MTB) contains specific oligonucleotides, nucleotides, dye	0.5	4 ml
Running Buffer (RB) ready to use contains buffer, <1% NaCl, <1% anionic tenside	2 ml	16 ml
Test rack with 96 tubes, Manual	1 of each	1 of each
Evaluation sheet	1	4

Ordering Information

GenoLyse[®] DNA extraction kit for 96 samples

order no. 51610

GenoQuick® MTB

Test de Biologie Moléculaire Rapide pour la Détection Directe de Souches Appartenant au Complexe *Mycobacterium tuberculosis* à partir d'Échantillons de Patients

Principe

Le test **GenoQuick® MTB** permet l'identification génétique rapide de souches appartenant au complexe *M. tuberculosis* à partir d'échantillons décontaminés de patients tels qu'expectorations (spontanées ou provoquées), matériel bronchique (lavages broncho-alvéolaires et aspirations bronchiques), sécrétions trachéales, sucs gastriques et urine. Le produit d'amplification est détecté qualitativement sur bandelette. En premier lieu, les amplicons simple brin s'hybrident avec les sondes spécifiques contenues dans le Mélange Amorces/Nucléotides (PNM). Ces complexes se fixent ensuite sélectivement à la bande test sur la bandelette réactive et sont visualisés grâce à un marquage à l'or.

Le test **GenoQuick® MTB** est un test direct pour le dépistage de patients suspectés de tuberculose.

La procédure complète comporte trois phases : (i) extraction d'ADN à partir d'échantillons décontaminés de patients (le kit **GenoLyse®** requis n'est pas fourni ; se référer au chapitre d'information sur les commandes), (ii) amplification multiplex à l'aide d'amorces différemment marquées (l'ADN polymérase thermostable nécessaire à la réalisation du test n'est pas fournie) avec hybridation, et (iii) détection sur la bandelette.

Conservation et Précautions

Dès réception, conserver le Mélange Amorces/Nucléotides (PNM) à 2-8°C et isolés de toute source d'ADN potentiellement contaminante. Si la durée de conservation doit excéder 4 semaines, conserver à -20°C. Il est recommandé d'aliqoter le PNM afin d'éviter les congélations/décongélations répétées. Conserver tous les autres composants du kit à 2-8°C. Après chaque utilisation, refermer hermétiquement les tubes contenant les bandelettes. La face interne des tubes est recouverte de dessiccant. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date de péremption. Ne pas mélanger les réactifs provenant de différents lots du kit.

Tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux et être manipulés comme tels. Les échantillons prélevés sur des patients à risques doivent être identifiés et manipulés dans des conditions de sécurité adéquates. Suivre les recommandations (fédérale, nationale, locale) d'hygiène, de sécurité et d'environnement. Se protéger à l'aide de vêtements adéquats et de gants.

Observer les précautions usuelles pour la préparation de l'amplification. Il est essentiel que le matériel et les réactifs utilisés pour l'extraction de l'ADN et pour la préparation de l'amplification soient exempts de DNases.

Contrôle de Qualité

Afin de contrôler le bon déroulement du test et le bon fonctionnement des composants du kit, chaque bandelette comporte 2 zones de contrôle :

- une zone de Contrôle Conjugué pour contrôler la fixation du conjugué sur la bandelette
- une zone de Contrôle d'Amplification afin de vérifier que la réaction d'amplification a été accomplie avec succès

Extraction de l'ADN

Des échantillons décontaminés de patients tels qu'expectorations (spontanées ou provoquées), matériel bronchique (lavages broncho-alvéolaires et aspirations bronchiques), sécrétions trachéales, sucs gastriques (de patients adultes uniquement) et urine sont utilisés comme matériel de départ pour l'extraction d'ADN. Le test ne doit pas être utilisé comme méthode de référence pour la détection du complexe *M. tuberculosis* en culture. Les échantillons doivent être traités par NALC/NaOH selon la publication du CDC « Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory ». L'espace de travail doit être exempt de toute trace d'ADN amplifié. Pour l'extraction d'ADN, le kit **GenoLyse**[®] (extraction d'ADN par lyse alcaline ; se référer au chapitre d'information sur les commandes) est utilisé et traité selon les directives du manuel d'utilisation. L'évaluation des performances du test **GenoQuick**[®] **MTB** a été effectuée en utilisant la méthode citée ci-dessus. Toute méthode d'extraction alternative doit être préalablement validée par l'utilisateur avant mise en oeuvre en routine.

Amplification

Préparer le mélange réactionnel (45 µl) dans une pièce exempte d'ADN. L'ADN de l'échantillon doit être rajouté dans une pièce séparée. **Une ADN polymérase de type « hot start » doit être utilisée exclusivement.**

Préparer le mélange suivant par tube :

- 35 µl de PNM – fourni avec le kit
- 5 µl de tampon d'incubation de la polymérase 10x – non fourni
- x µl de $MgCl_2$ ¹⁾ – non fourni
- 1-2 unité(s) d'ADN polymérase thermostable (se référer au manuel) – non fourni
- y µl d'eau qsp 45 µl (hors volume de l'enzyme) – non fourni
- Ajouter 5 µl de solution d'ADN pour atteindre un volume final de 50 µl (hors volume de l'enzyme).

¹⁾ Selon le système tampon/enzyme utilisé, la concentration optimale de $MgCl_2$ peut varier de 1,5 à 4 mM. A noter que certains tampons contiennent déjà le $MgCl_2$.

L'évaluation des performances du test **GenoQuick® MTB** a été réalisée avec la HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen). Lors de l'utilisation de cette enzyme, les volumes/réaction sont les suivants :

- 35 µl de PNM – fourni avec le kit
- 5 µl de tampon de PCR 10x pour HotStarTaq (contient 15 mM $MgCl_2$) – non fourni
- 5 µl 25 mM de $MgCl_2$ – non fourni
- 0,2 µl (1 U) HotStarTaq – non fourni
- 5 µl de solution d'ADN (ajouté dans une pièce séparée)

La concentration finale du mix réactionnel en $MgCl_2$ est 4 mM.

Déterminer le nombre d'échantillons à amplifier (nombre d'échantillons à analyser + contrôles). Pour un contrôle de contamination, par exemple, la solution d'ADN à amplifier est remplacée par 5 µl d'eau. Préparer une solution mère contenant tous les réactifs à l'exception de l'ADN, et homogénéiser (ne pas vortexer). Aliquoter 45 µl du mélange réactionnel dans les tubes de PCR.

Profil d'amplification²⁾ :

15 min 95°C 1 cycle

30 sec 95°C	}	40 cycles
40 sec 55°C		
30 sec 72°C		

2 min 95°C 1 cycle

5 min 20°C 1 cycle

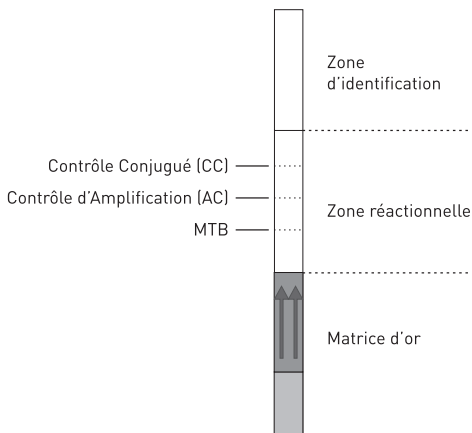
(∞ 8°C)

²⁾ S'applique à la Taq polymérase utilisée au cours de la validation. En cas d'utilisation d'autres Taq polymérases de type « hot start », la durée de la première étape devra peut-être être raccourcie (se référer au manuel de l'enzyme).

Les produits de l'amplification peuvent être conservés entre +8 et -20°C.

Néanmoins, prière de noter que les produits d'hybridation présentent une stabilité limitée. En conséquence, répéter les étapes d'hybridation du programme d'amplification (2 min 95°C, 5 min 20°C) si le délai entre l'amplification et la détection excède 30 minutes en cas de conservation des échantillons à température ambiante (15-25°C), ou excède un jour en cas de conservation à +8°C ou -20°C.

Détection



Remarque : Cette bandelette n'est pas représentée dans sa taille originale.

Préparation

Immédiatement avant de débuter la détection, retirer du tube une bandelette pour chaque échantillon testé et l'identifier à l'aide d'un crayon dans la zone blanche. La bandelette est pratiquement entièrement recouverte d'un film transparent et peut être manipulée au niveau de la zone d'identification. Pour chaque échantillon, pipeter 100 µl de Tampon de Migration (RB) dans un tube du portoir fourni.

1. Déposer 10 µl d'amplicon dans un tube contenant 100 µl de tampon RB, et homogénéiser.

La couleur du tampon RB devient jaune pâle après addition des amplicons.

2. Déposer la bandelette avec la matrice d'or orientée vers le bas dans le tube et incuber 10 minutes à température ambiante.

Des résultats positifs peuvent apparaître plus tôt ; néanmoins le délai recommandé pour la lecture doit être respecté. Un temps d'incubation rallongé peut en revanche entraîner un changement d'intensité.

3. Retirer les bandelettes des tubes pour la lecture, noter les résultats sur la feuille de résultats fournie (voir chapitre Évaluation et Interprétation des Résultats), et éliminer les bandelettes.

La conservation des bandelettes comporte un risque de contamination. De plus, le séchage peut entraîner des variations dans l'intensité du signal. Il est donc recommandé d'éliminer ou d'archiver numériquement les bandelettes après avoir documenté les résultats.

Éliminer les bandelettes et les tubes contenant le tampon résiduel dans un container contenant une solution d'hypochlorite de sodium 1,5% fraîchement préparée. Traiter les surfaces de travail avec une solution d'hypochlorite de sodium 1,5% et rincer à l'eau.

Évaluation et Interprétation des Résultats

Une feuille d'évaluation est fournie avec le kit.

Contrôle Conjugué (CC)

Une ligne doit se développer dans cette zone, attestant de l'efficacité du conjugué et de la migration.

Contrôle d'Amplification (AC)

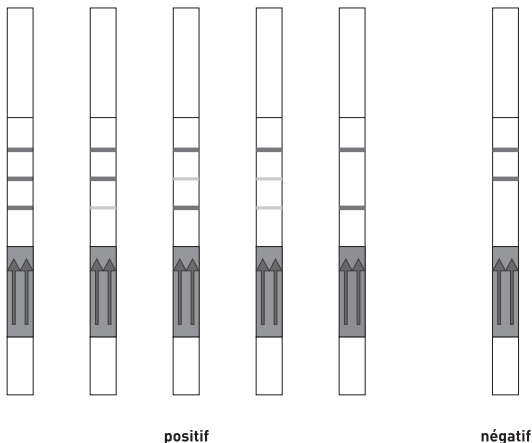
Lorsque le test a été correctement réalisé, un amplicon de contrôle se fixe dans la zone Contrôle d'Amplification de la bandelette. Le développement d'un signal à ce niveau exclut toute erreur durant les phases de pré-amplification et d'amplification, ainsi que la présence d'inhibiteurs. Lors de résultats positifs, le Contrôle d'Amplification peut présenter un signal faible ou même disparaître complètement, dû à un phénomène de compétition au cours de l'amplification ou à la présence d'inhibiteurs en quantité limitée. Néanmoins, il n'est pas nécessaire de répéter l'étape d'amplification.

Lors de résultats négatifs, le Contrôle d'Amplification doit présenter un signal d'intensité équivalente au Contrôle d'Amplification de la bandelette du contrôle contamination. Une bande AC faible ou inexistante en cas de tests négatifs indique une erreur au niveau de l'amplification ou la présence d'inhibiteurs, ou bien encore une inhibition due à une surcharge du système (voir chapitre Causes d'Erreurs). Dans ce cas, le test n'est pas validé et les échantillons doivent être re-testés.

Complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)

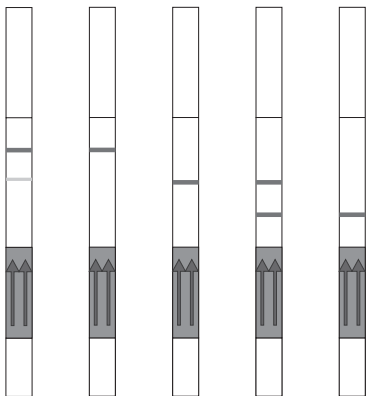
Cette zone de réaction documente la présence d'une souche du complexe *M. tuberculosis*. L'intensité de cette bande varie selon le nombre de cellules dans l'échantillon du patient. En cas de signal très faible, l'échantillon incriminé doit être testé à nouveau.

La figure ci-dessous indique les profils valides possibles :



Note : Les intensités des bandes dans les images ci-dessus ne préfigurent en aucun cas des intensités de référence à obtenir, mais sont représentées uniquement pour refléter la variété des intensités pouvant être obtenues.

La figure ci-dessous montre les profils possibles entraînant un résultat non valide :



non valide

Note : Les intensités des bandes dans les images ci-dessus ne préfigurent en aucun cas des intensités de référence à obtenir, mais sont représentées uniquement pour refléter la variété des intensités pouvant être obtenues.

Limitations

Le test a été validé pour une utilisation directe à partir d'échantillons décontaminés de patients. Les échantillons cliniques testés incluent : expectorations (spontanées ou provoquées), matériel bronchique (lavages broncho-alvéolaires et aspirations bronchiques), sécrétions trachéales, sucs gastriques (de patients adultes uniquement) et urine. Il incombe à l'utilisateur de valider l'utilisation de ce test avec d'autres types d'échantillons.

Comme toute méthode de détection d'ADN, ce test détecte l'ADN à partir de bactéries viables et non-viables. Par conséquent, le test **GenoQuick® MTB** ne peut être utilisé pour effectuer le suivi d'une thérapie antimicrobienne.

L'application excessive d'ADN pouvant entraîner une inhibition de la PCR ou de la détection, il est important de ne pas utiliser le test pour l'analyse de culture de *Mycobacterium*.

Le test **GenoQuick® MTB** fournit des résultats qualitatifs. L'intensité des bandes MTB n'informe en aucun cas sur la charge bactérienne de l'échantillon de départ. Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité que le nombre de cellules de l'organisme cible soit supérieur à la limite de détection du test.

Comme avec tout test de diagnostic, les résultats obtenus avec ce test direct doivent être interprétés en tenant compte de toute autre donnée de laboratoire ou clinique à la disposition du médecin responsable.

Avant de procéder à l'amplification, l'ADN bactérien doit être extrait à l'aide du kit **GenoLyse®** (se référer aux chapitres sur l'extraction d'ADN et d'information sur les commandes). L'ADN cible doit avoir été amplifié efficacement pendant la réaction d'amplification.

Le test fonctionne dans les limites de la région du génome choisie pour les amorces et les sondes. Un séquençage potentiel doit être réalisé séparément. Comme dans tout système de détection basé sur l'hybridation, il existe la possibilité que des variations situées dans la séquence d'ADN génomique cible à partir de laquelle les amorces et les sondes ont été choisies et pour lesquelles le test n'a pas été conçu, entraînent un résultat erroné. En raison de la forte variabilité des génomes bactériens, il est possible que certaines rares variations d'espèces ne soient pas détectées.

Le test reflète l'état actuel des connaissances de la société Hain Lifescience. L'utilisation de ce kit est réservée à un personnel qualifié déjà formé et rodé aux techniques de biologie moléculaire.

L'évaluation des performances du test a été réalisée à l'aide de la Taq polymérase HotStarTaq fournie par la société Qiagen (Hilden, Allemagne). L'extraction d'ADN a été effectuée à l'aide du kit **GenoLyse®**. Comme les performances de ce test n'ont pas été validées pour toutes les polymérases et kits pour l'extraction de l'ADN disponibles sur le marché, il reste à la charge de l'utilisateur de valider ce test en cas d'utilisation d'autres polymérases ou d'autres méthodes d'extraction que celles mentionnées ci-dessus.

Les données sur les performances du test peuvent être téléchargées sur le site internet : www.hain-lifescience.com

Causes d'Erreurs

Résultats faibles ou absence de signal (incluant la zone de Contrôle Conjugué)

- Volume de Tampon de Migration insuffisant ou en excès déposé dans le tube.
- Excès d'amplicons ajouté au Tampon de Migration.
- Bandelette insuffisamment plongée dans le Tampon de Migration.

Contrôle d'Amplification absent ou faible sans aucun signal MTB

- Amplicons non dénaturés et non hybridés. Répéter l'hybridation (voir chapitre Amplification).
- Délai entre la dénaturation et l'incubation supérieur à 30 minutes, ou température des tubes supérieure à la température ambiante (voir chapitre Amplification).
- Quantité d'amplicons insuffisante déposée dans le Tampon de Migration.
- La qualité de l'ADN extrait n'a pas permis une bonne amplification. Répéter l'extraction et l'amplification ; Si nécessaire, essayer une méthode d'extraction différente (voir chapitre Extraction de l'ADN).
- Concentration d'ADN utilisée pour l'amplification trop élevée, due par exemple à un ADN extrait à partir de bactéries cultivées et insuffisamment dilué

Résultat inattendu

- Contamination de l'ADN extrait et/ou des réactifs d'amplification avec de l'ADN précédemment extrait ou amplifié. Lorsque les réactifs d'amplification sont contaminés, un échantillon de contrôle de contamination entraîne également le développement des lignes tests.
- Contamination des tubes adjacents par éclaboussures durant le dépôt des amplicons.
- Quantité insuffisante d'ADN ajoutée à la réaction d'amplification, par exemple due à l'absence ou à un trop petit nombre de cellules dans l'échantillon du patient.
- L'espèce bactérienne isolée ne peut pas être identifiée avec ce test.

Matériel Requis mais Non Fourni

- ADN polymérase thermostable avec tampon (enzyme de type « hot start » recommandée, taux d'extension : [2-4 kb/min à 72°C, demi-vie : 10 min à 97°C, 60 min à 94°C, rendement d'amplification : >10⁵)
- Chronomètre
- Eau (niveau de pureté pour biologie moléculaire)
- Embouts de pipettes stériles avec filtre
- Gants à usage unique
- Kit **GenoLyse**[®] (voir chapitre Commandes)
- Microtubes pour thermocycleur ; exempts de contamination par DNase et RNase
- Pipettes réglables pour 10, 20, 200, et 1000 µl
- Solution d'hypochlorite de sodium (Eau de javel ménagère exempte de colorant et sans parfum)
- Thermocycleur (taux de chauffage : 3°C/sec, taux de refroidissement : 2°C/sec, précision : +/-0,2°C)

Composition du Kit

	12	96
Bandelette sensibilisées avec des sondes spécifiques (DS GQ MTB)	12	96
Mélange Amorces/Nucléotides (PNM GQ MTB) contient les oligonucléotides spécifiques, nucléotides, colorant	0,5 ml	4 ml
Tampon de Migration (RB) <i>prêt à l'emploi</i> contient du tampon, NaCl <1%, détergent anionique <1%	2 ml	16 ml
portoir avec 96 tubes, manuel d'utilisation	1	1
feuille d'évaluation	1	4

Commandes

Kit **GenoLyse**[®] d'extraction d'ADN pour 96 échantillons réf 51610

GenoQuick® MTB

Test rapido genetico molecolare per la rilevazione diretta di *Mycobacterium tuberculosis* complex dal campione biologico del paziente

Metodologia

Il test **GenoQuick® MTB** permette l'identificazione molecolare rapida di *M. tuberculosis* complex direttamente da campioni biologici decontaminati del paziente, come escreato (indotto o espettorato), materiale bronchiale (lavaggi broncoalveolari e aspirati bronchiali), secrezione tracheale, aspirato gastrico e urine. Il prodotto di amplificazione viene rilevato qualitativamente tramite un dipstick. Dapprima, gli ampliconi a singolo filamento ibridizzano con specifiche sonde incluse nella Mix di Primers/Nucleotidi. Questi complessi si legano poi in modo selettivo alla banda test sul dipstick e vengono visualizzati tramite legame con oro.

GenoQuick® MTB è un test diretto per lo screening di pazienti con una possibile infezione tubercolare.

L'intera procedura è suddivisa in tre fasi successive: (i) isolamento del DNA direttamente da campioni biologici del paziente (il kit necessario **GenoLyse®** non è fornito; vedi il capitolo Informazioni per gli ordini), (ii) amplificazione multiplex con primers marcati in modo diverso (la DNA polimerasi termostabile necessaria non è fornita) con ibridazione successiva, e (iii) rilevazione tramite dipstick.

Conservazione e precauzioni

Conservare la Mix di Primers/Nucleotidi (PNM) a 2-8°C, in un luogo lontano da ogni possibile contaminazione con DNA. Se è necessaria una conservazione più prolungata (oltre 4 settimane) conservare a -20°C. Per evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti, si consiglia di aliquotare la PNM. Conservare tutti gli altri componenti a 2-8°C. Chiudere con attenzione il contenitore con i dipsticks dopo ogni utilizzo; la parete interna del contenitore è rivestita di dissecante. Non utilizzare i reattivi oltre la loro data di scadenza. Non mescolare reattivi appartenenti a numeri di lotto diversi.

I campioni prelevati dai pazienti devono essere sempre considerati potenzialmente infettivi. I campioni di pazienti a rischio devono essere sempre etichettati e maneggiati in condizioni adeguate di sicurezza. Osservare tutte le norme legislative locali e

nazionali in fatto di sicurezza e protezione dell'ambiente. Indossare sempre guanti e abiti protettivi.

Osservare le consuete norme e precauzioni per l'esecuzione della reazione di amplificazione. E' essenziale che tutti i reattivi e i materiali utilizzati per l'isolamento del DNA e l'esecuzione dell'amplificazione siano privi di DNasi.

Controllo di qualità

Al fine di validare la corretta esecuzione del test e il regolare funzionamento dei reattivi del kit, ogni dipstick presenta 2 bande di controllo:

- una banda di Controllo del Coniugato per verificare l'avvenuto legame del coniugato sul dipstick
- una banda di Controllo di Amplificazione per controllare la riuscita della reazione di amplificazione

Isolamento del DNA

Come materiali di partenza per l'isolamento del DNA, devono essere usati i seguenti campioni decontaminati di pazienti: escreato (indotto o espettorato), materiale bronchiale (lavaggi broncoalveolari e aspirati bronchiali), secrezione tracheale, aspirato gastrico (solo da adulti) e urine. Il test non deve essere utilizzato come metodo di rilevazione di *M. tuberculosis* complex da colture. I campioni devono essere processati con il metodo NALC/NaOH in accordo con la pubblicazione CDC: "Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory". L'area di lavoro deve essere libera da contaminazione con DNA amplificato.

Per l'estrazione di DNA é utilizzato il kit **GenoLyse**[®] (estrazione di DNA tramite lisi alcalina; vedi il capitolo Informazioni per gli ordini) in accordo con il manuale di istruzioni. La valutazione della performance del kit **GenoQuick**[®] **MTB** è stata effettuata utilizzando il metodo sopra riportato. Qualsiasi metodo di isolamento alternativo deve essere validato dall'utilizzatore prima dell'uso.

Amplificazione

Preparare la mix di amplificazione (45 µl) in uno spazio lontano da possibile contaminazione con DNA. I campioni di DNA dovrebbero essere aggiunti in una stanza dedicata. **L'utilizzo di una DNA polimerasi tipo "Hot Start" è decisivo.**

Per ogni campione miscelare:

- 35 µl di PNM – fornito nel kit
- 5 µl di tampone specifico per polimerasi, 10x – non fornito
- x µl di soluzione di $MgCl_2$ ¹¹ – non fornita
- 1-2 unità di DNA polimerasi (riferirsi al manuale d'uso) – non fornita
- y µl di acqua. La quantità aggiunta deve portare ad un volume finale della mix di 45 µl (non considerare il volume dell'enzima) – non fornita
- Aggiungere 5 µl di soluzione di DNA fino ad un volume finale di 50 µl (non considerare il volume della Taq).

¹¹ La concentrazione ottimale di $MgCl_2$ dipende dal tipo di enzima usato e può variare fra 1,5 e 4 mM. Tener conto della quantità di $MgCl_2$ già eventualmente presente nel tampone.

La valutazione della performance del test **GenoQuick® MTB** è stata effettuata utilizzando HotStarTaq DNA Polymerase di Qiagen. Quando si usa questo enzima, sono richiesti i seguenti quantitativi per ogni campione:

- 35 µl di PNM – fornito nel kit
- 5 µl 10x PCR Buffer per HotStarTaq (contiene 15 mM $MgCl_2$) – non fornito
- 5 µl 25 mM di soluzione di $MgCl_2$ – non fornita
- 0,2 µl (1 U) HotStarTaq – non fornita
- 5 µl di soluzione di DNA (da aggiungere in un'area separata)

La concentrazione finale di $MgCl_2$ in questa mix di amplificazione è di 4 mM.

Determinare il numero dei campioni da amplificare, considerando il numero dei campioni da analizzare e dei campioni di controllo. Per il controllo di contaminazione aggiungere, ad esempio, 5 µl di acqua sterile invece della soluzione di DNA. Preparare una master mix contenente tutti i reagenti ad eccezione del DNA e miscelare bene (senza usare il vortex). Aliquotare la mix in volumi di 45 µl nelle provette per PCR precedentemente preparate.

Protocollo di amplificazione²⁾:

15 min 95°C 1 ciclo

30 sec 95°C	}	40 cicli
40 sec 55°C		
30 sec 72°C		

2 min 95°C 1 ciclo

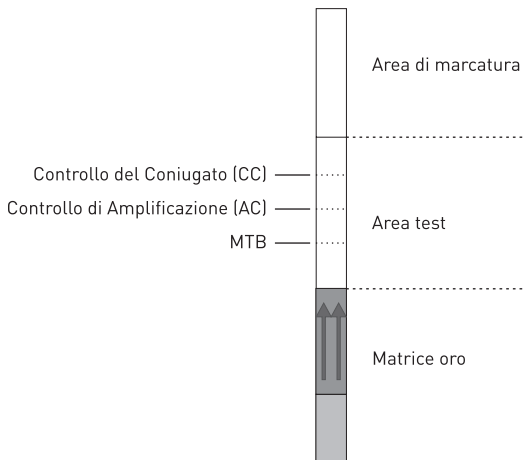
5 min 20°C 1 ciclo

(∞ 8°C)

²⁾ Si applica con la Taq polimerasi utilizzata per la validazione. E' possibile che il tempo del primo step debba essere ridotto quando vengono usate altre hot start DNA polimerasi (riferirsi al manuale dell'enzima).

I prodotti amplificati possono essere conservati ad una temperatura fra +8 e -20°C. Attenzione: Il prodotto di ibridazione ha tuttavia una stabilità limitata. Quindi, se l'intervallo di tempo tra amplificazione e ibridazione supera i 30 minuti a temperatura ambiente (15-25°C) oppure supera 1 giorno tra +8 e -20°C, è necessario ripetere i passaggi di ibridazione del programma (2 minuti a 95°C, 5 minuti a 20°C).

Rilevazione



Nota: Il dipstick non è visualizzato nel formato originale.

Preparazione

Subito prima di iniziare la fase di rilevazione, prelevare un dipstick per ogni campione dal tubo dei dipsticks e numerarlo a matita nell'apposita area. Il dipstick è quasi completamente ricoperto da un rivestimento trasparente e quindi può essere toccato solo nell'area di marcatura. Per ogni campione dispensare 100 μ l di Tampone di Corsa (RB) in una provetta del rack inclusa nel kit.

- 1. Aggiungere 10 μ l di ampliconi ibridizzati in una provetta riempita con 100 μ l di RB e miscelare accuratamente con il puntale.**
Il colore di RB vira a giallo chiaro dopo l'aggiunta degli ampliconi.
- 2. Inserire il dipstick con la matrice oro rivolta verso il fondo della provetta (frecce rivolte verso l'alto) nella relativa provetta e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente.**

I risultati positivi possono essere rilevati più velocemente; tuttavia rispettare il tempo indicato. Un'incubazione prolungata, d'altro canto, può comportare un cambiamento nell'intensità del segnale.

3. Rimuovere i dipsticks dalle provette per effettuare la lettura e riportare i risultati sul foglio di valutazione fornito (consultare il capitolo Lettura e interpretazione dei risultati), eliminare poi i dipsticks.

La conservazione dei dipsticks comporta un rischio di contaminazione; inoltre, l'asciugatura dei dipsticks, può cambiare l'intensità del segnale. Per questo motivo, dopo la refertazione del risultato, i dipsticks già sviluppati devono essere eliminati o archiviati digitalmente.

Eliminare i dipsticks e le provette con il Tampone di Corsa rimanente, in un recipiente contenente una soluzione di ipoclorito di sodio all'1,5% di recente preparazione ed eliminare i guanti. Pulire l'area di lavoro con una soluzione di ipoclorito di sodio all'1,5% di recente preparazione e sciacquare con acqua.

Lettura e interpretazione dei risultati

Nel kit è fornita una scheda di valutazione.

Controllo del Coniugato (CC)

In questa zona deve comparire una banda, che attesta l'efficacia del legame del coniugato e l'adeguato flusso di capillarità attraverso il dipstick.

Controllo di Amplificazione (AC)

Se il test viene eseguito correttamente, un amplicone di controllo si legherà alla banda di Controllo di Amplificazione sul dipstick. Se si sviluppa questa banda, possono essere esclusi errori nella messa a punto e nella performance della reazione di amplificazione e il trascinarsi di inibitori dell'amplificazione.

In caso di risultato positivo del test, la banda di Controllo di Amplificazione può risultare debole oppure non comparire del tutto. Questo può essere dovuto ad una reazione di competizione durante l'amplificazione o alla presenza di un limitato quantitativo di inibitori dell'amplificazione. In questo caso, la reazione di amplificazione è avvenuta comunque correttamente e il test non deve essere ripetuto.

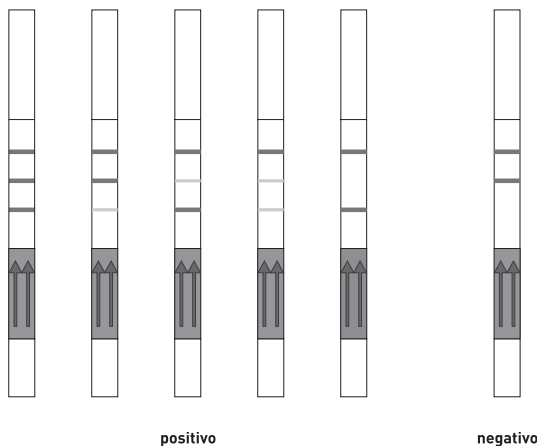
Nel caso di un risultato negativo, l'intensità di AC potrebbe essere della stessa intensità di AC del controllo di contaminazione. La mancanza o la debole intensità

della banda AC in caso di risultato negativo del test indica errori nella messa a punto dell'amplificazione, trascinamento di inibitori dell'amplificazione o inibizione dovuta a un sovraccarico del sistema del test (vedi il capitolo Risoluzione dei problemi). In questo caso il test non è valido e il relativo campione deve essere ripetuto.

***Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB)**

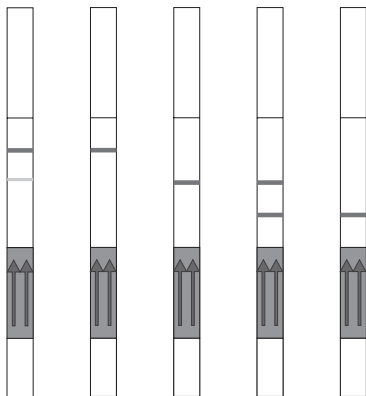
Questa banda indica la presenza di un ceppo appartenente al *M. tuberculosis* complex. L'intensità di questa banda varia a seconda del numero di cellule nel campione del paziente. Si consiglia di ripetere il campione che risulti in un segnale molto debole.

La figura sottostante mostra i possibili patterns di bande validi:



Nota: L'intensità delle bande riportate nelle figure soprastanti non costituiscono le intensità di segnale di riferimento per effettuare la valutazione dei risultati del test, ma intendono fornire esempi di possibili varianti di intensità di bande.

La figura sottostante mostra possibili patterns di bande che rappresentano risultati non validi:



non validi

Nota: L'intensità delle bande riportate nelle figure soprastanti non costituiscono le intensità di segnale di riferimento per effettuare la valutazione dei risultati del test, ma intendono fornire esempi di possibili varianti di intensità di bande.

Limitazioni

Il test è stato validato per l'utilizzo di un campione diretto decontaminato del paziente. Sono stati testati campioni clinici come escreato (indotto o espettorato), materiale bronchiale (lavaggi broncoalveolari e aspirati bronchiali), secrezione tracheale, aspirato gastrico (solo da adulti) e urine. La validazione dell'applicabilità di questo test ad altri tipi di campioni è a carico dell'utilizzatore.

Come ogni metodo di rilevazione di DNA, questo sistema rileva il DNA di batteri vivi e non vitali. Di conseguenza, il test **GenoQuick® MTB** non può essere utilizzato per monitorare la progressione o il successo di un trattamento con una terapia antimicrobica.

L'utilizzo di DNA in eccesso può portare all'inibizione della PCR o della rilevazione; il test, quindi, non deve essere utilizzato come metodo standard per l'analisi di colture di *Mycobacterium*.

Il test **GenoQuick® MTB** fornisce risultati qualitativi. L'intensità della banda MTB sul dipstick **Geno** non fornisce informazioni sul numero di cellule nel campione. Un risultato negativo del test non esclude la possibilità che il numero di cellule di un organismo rilevabile sia falsamente al di là del limite di rilevazione del test.

Come per altri test diagnostici, i risultati di questo test diretto possono essere interpretati solo insieme ad altri risultati di laboratorio e a dati clinici resi disponibili dal responsabile medico.

Prima dell'amplificazione, isolare il DNA batterico utilizzando il kit **GenoLyse®** (vedi i capitoli Isolamento del DNA e Informazioni per gli ordini). Assicurarsi che il DNA venga efficientemente amplificato durante la reazione di amplificazione.

Il test opera strettamente entro i limiti della regione genomica in cui sono stati scelti i primers e le sonde. Un'eventuale analisi di sequenziamento può essere effettuata come test di completamento. Come per ogni sistema di rilevazione basato su ibridazione genica esiste la possibilità che il test, in caso di variazioni nelle sequenze geniche dalle quali i primers e le sonde sono stati scelti e per le quali il test non è stato progettato, possa dare falsi risultati. A causa dell'alta variabilità del materiale genomico è possibile che potrebbero non essere rilevate variazioni molto rare delle specie. Il test riflette l'attuale stato di conoscenza di Hain Lifescience.

L'utilizzo di questo test è limitato a personale qualificato, ben addestrato sulla procedura del test e che conosce bene le tecniche di biologia molecolare.

Le valutazioni di questo test sono state eseguite utilizzando l'enzima HotStarTaq Polymerase fornito da Qiagen (Hilden, Germania). Per l'isolamento del DNA è stato utilizzato il kit **GenoLyse®**. Poiché le caratteristiche di performance di questo test non sono state validate per tutte le polimerasi e i kits di estrazione di DNA disponibili in commercio, la validazione dell'applicabilità di polimerasi o metodi di isolamento del DNA, diversi da quelli menzionati sopra, è a carico dell'utilizzatore.

I dati di performance del test possono essere richiesti attraverso il sito: www.hain-lifescience.com

Risoluzione dei problemi

Bande deboli o assenti (compreso il Controllo del Coniugato)

- Tampone di Corsa aggiunto alla provetta insufficiente o eccessivo.
- Eccesso di ampliconi aggiunti al Tampone di Corsa.
- Dipstick non correttamente immerso nel Tampone di Corsa.

Controllo di Amplificazione assente o debole senza banda MTB

- Amplicone non denaturato e ibridizzato. Ripetere l'ibridazione (vedi capitolo Amplificazione).
- Tempo tra denaturazione e rilevazione superiore a 30 minuti o campioni mantenuti ad una temperatura superiore a quella ambientale. Ripetere l'ibridazione (vedi capitolo Amplificazione).
- Quantità nulla o insufficiente di amplicone aggiunto al Tampone di Corsa.
- La qualità del DNA isolato non permette un'amplificazione efficiente. Ripetere l'isolamento del DNA e la reazione di amplificazione; se necessario utilizzare un metodo alternativo di isolamento del DNA (vedi capitolo Isolamento del DNA).
- Eccessiva concentrazione del DNA utilizzato per l'amplificazione, ad esempio a causa dell'utilizzo di DNA da coltura non sufficientemente diluito.

Risultati inattesi

- Contaminazione del DNA isolato e/o dei reattivi di amplificazione con DNA isolato e/o amplificato. Quando sono contaminati i reattivi di amplificazione, anche un controllo di contaminazione mostra il relativo pattern di bande.
- Contaminazione delle provette adiacenti durante l'aggiunta dell'amplicone.
- Quantità nulla o insufficiente di DNA aggiunto per la reazione di amplificazione, dovuta, ad esempio, all'assenza o a un quantitativo limitato di cellule nel campione del paziente.
- I batteri isolati non possono essere differenziati con questo test.

Materiale richiesto ma non fornito

- Acqua distillata sterile, per biologia molecolare
- DNA Polimerasi Termostabile con relativo tampone. Si raccomanda: tipo "Hot start"; capacità di estensione 2-4 kb/min a 72°C; tempo di emivita 10 min a 97°C e 60 min a 94°C; efficienza di amplificazione >10⁵ volte
- Guanti monouso
- Kit **GenoLyse**[®] (vedi il capitolo Informazioni per gli ordini)
- Pipette regolabili da 10, 20, 200, 1000 µl
- Provette per PCR, DNasi e RNasi free
- Puntali monouso sterili con filtro
- Soluzione di ipoclorito di sodio (candeggiante comune inodore e senza coloranti)
- Termociclatore automatico (velocità di riscaldamento 3°C/sec; velocità di raffreddamento 2°C/sec; precisione +/-0,2°C)
- Timer

Contenuto del kit

	12	96
Dipsticks coattati con sonde specifiche (DS GQ MTB)	12	96
Mix di primers/nucleotidi (PNM GQ MTB) contiene oligonucleotidi specifici, nucleotidi, colorante	0,5 ml	4 ml
Tampone di corsa (RB) pronto all'uso contiene tampone, NaCl <1%, tensioattivo anionico <1%	2 ml	16 ml
Rack con 96 provette, manuale d'uso	1 cad.	1 cad.
Schede di valutazione	1	4

Informazioni per gli ordini

GenoLyse[®] kit di isolamento del DNA per 96 campioni

no. d'ordine 51610

GenoQuick® MTB

Test de Genética Molecular para la Detección de *Mycobacterium tuberculosis* Complex a partir de Muestras Clínicas

Metodología

El ensayo **GenoQuick® MTB** permite la rápida identificación mediante genética molecular del complejo *M. tuberculosis* directamente de muestra descontaminada del paciente, como esputo (inducido o por expectoración), muestras bronquiales (lavados broncoalveolares y aspirados bronquiales), secreción traqueal, jugo gástrico y orina. El producto de amplificación se detecta cualitativamente en un dipstick. Primero, los amplicones de cadena sencilla hibridan con sondas específicas, incluida en la Mezcla del Primer/Nucleótido (PNM). Posteriormente, estos complejos se unen, selectivamente, a la banda del ensayo contenida en el dipstick y se visualiza mediante un marcaje con oro.

El ensayo **GenoQuick® MTB** es un ensayo directo para cribado de pacientes con una posible infección tuberculosa.

El procedimiento completo se divide en tres pasos: (i) extracción de DNA a partir de muestras clínicas descontaminadas (el kit necesario, **GenoLyse®**, no se incluye en este kit; ver capítulo de información para pedidos). (ii) amplificación múltiple con primers con diferentes marcajes (la DNA polimerasa termoestable necesaria no está incluida), posterior hibridación, y (iii) detección sobre el dipstick.

Almacenamiento y Precauciones

Almacene la Mezcla del Primer/Nucleótido (PNM) a 2-8°C a su llegada, aislándola de cualquier fuente potencial de DNA contaminante. Si se requiere almacenar durante más de 4 semanas, almacene a -20°C. A fin de evitar congelaciones y descongelaciones repetidas, alicuote el PNM. Almacene el resto de los componentes del kit en 2-8°C. Cierre correctamente los tubos que contienen los dipsticks después de cada uso; la pared interna del tubo está recubierta con desecante. No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad. No mezcle reactivos de diferentes números de lote.

Las muestras de pacientes deben considerarse siempre como potencialmente infecciosas. Las muestras procedentes de pacientes de riesgo han de ser etiquetadas

y manipuladas bajo condiciones de seguridad. Observe todas las normas medioambientales y de seguridad, tanto federales, estatales como locales. Lleve siempre guantes y ropa adecuada.

Observe las precauciones normales para preparar la amplificación. Es esencial que todos los materiales y reactivos usados para extracción de DNA y amplificación estén libres de DNAsas.

Control de Calidad

A fin de validar el correcto funcionamiento del test y la funcionalidad de los componentes del kit, cada dipstick incluye 2 zonas de control:

- una zona de Control de Conjugado para comprobar la unión del conjugado al dipstick
- una zona de Control de Amplificación para comprobar la amplificación correcta de la reacción

Extracción de DNA

Como material de partida se utilizarán muestras clínicas descontaminadas como esputo (inducido o por expectoración), muestras bronquiales (lavados broncoalveolares y aspirados bronquiales), secreción traqueal, jugo gástrico (únicamente en adultos) y orina. Este test no debe ser utilizado como método standard para la detección de *M. tuberculosis* complex a partir de cultivo. Las muestras deben procesarse utilizando el método "NALC/NaOH" según la publicación de la CDC "Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory". La zona de trabajo ha de estar libre de DNA amplificado.

Para la extracción de DNA se utiliza el kit de extracción **GenoLyse**[®] (extracción de DNA mediante lisis alcalina; ver capítulo de Información para Pedidos), cuyo procedimiento se describe en el manual de dicho kit. La evaluación del kit **GenoQuick**[®] **MTB** fue llevada a cabo utilizando el método descrito anteriormente. Cualquier método de extracción alternativo deberá ser validado por el usuario antes de ser utilizado.

Amplificación

Prepare la mezcla de amplificación (45 µl) en una habitación libre de DNA. La muestra debe añadirse en un área separada. **Es crucial el empleo de una polimerasa hot start.**

Mezcle por tubo:

- 35 µl de PNM – suministrado
- 5 µl 10x de tampón para incubación de polimerasa – no suministrado.
- x µl de solución $MgCl_2$ ¹¹ – no suministrado
- 1-2 unidades de DNA polimerasa termoestable (consulte el manual) – no suministrado
- y µl de agua para obtener un volumen de 45 µl (sin considerar el volumen de enzima) – no suministrado.
- Añada 5 µl de solución de DNA para obtener un volumen final de 50 µl (sin considerar el volumen de enzima).

¹¹ Dependiendo del sistema enzima/tampón usado, la concentración óptima de $MgCl_2$ puede variar entre 1,5 y 4 mM. Tenga en cuenta que algunos tampones para incubación ya contienen $MgCl_2$.

La evaluación del rendimiento del ensayo **GenoQuick® MTB** fue realizada utilizando la Polimerasa HotStarTaq DNA de Qiagen. Las cantidades necesarias por muestra cuando utilice esta enzima son las siguientes:

- 35 µl de PNM – suministrado
- 5 µl 10x PCR Buffer de la HotStarTaq (contiene 15 mM de $MgCl_2$) – no suministrado
- 5 µl 25 mM de solución $MgCl_2$ – no suministrado
- 0,2 µl (1 U) de HotStarTaq – no suministrado
- 5 µl de solución de DNA (añada el DNA en una zona distinta)

La concentración final de $MgCl_2$ en la mezcla de amplificación será de 4 mM.

Determine el número de muestras a amplificar (número de muestras a analizar más las muestras de control). Por ejemplo, un control de contaminación contiene 5 µl de agua en lugar de solución de DNA. Prepare una mezcla maestra que contenga todos los reactivos, excepto la solución de DNA, y mezcle bien. No utilice vortex. Alicuote la mezcla madre en volúmenes de 45 µl en tubos preparados de PCR.

Perfil de amplificación²⁾:

15 min 95°C 1 ciclo

30 seg 95°C }
40 seg 55°C } 40 ciclos
30 seg 72°C }

2 min 95°C 1 ciclo

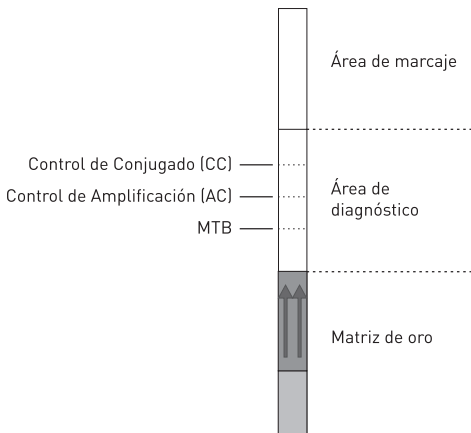
5 min 20°C 1 ciclo

(∞ 8°C)

²⁾ Aplicable a la taq polimerasa utilizada para la validación. Cuando se utilicen otras DNA polimerasas hot start, el intervalo de tiempo del primer paso puede ser reducido (consulte el manual de la enzima).

Los productos para amplificación pueden almacenarse entre +8 y -20°C. Por favor, tenga en cuenta que el producto de hibridación tiene solamente una estabilidad limitada. Por tanto, repita los pasos de hibridación del programa del termociclador (2 min 95°C, 5 min 20°C) si el intervalo de tiempo transcurrido entre la amplificación y la detección es >30 min a temperatura ambiente (15-25°C) y >1 día entre +8 y -20°C, respectivamente.

Detección



Nota: El dipstick no se muestra a tamaño original.

Preparación

Inmediatamente antes de comenzar la detección, extraiga un dipstick del tubo e identifíquelos con un lapicero sobre el área de marcaje. El dipstick está casi completamente cubierto con un film transparente y puede, por tanto, ser tocado en el área de marcaje. Pipetee, para cada muestra, 100 μ l de Tampón de Migración (RB) en un tubo de ensayo, de la gradilla incluida en el kit.

- 1. Añada 10 μ l del amplicón hibridado a un tubo con 100 μ l RB y pipetee resuspendiendo arriba y abajo para mezclar bien.**

El color del RB cambiará a amarillo pálido después de añadir el amplicón.

- 2. Coloque el dipstick con la matriz de oro boca abajo (las flechas apuntando hacia arriba) en su respectivo tubo e incube durante 10 minutos a temperatura ambiente.**

Los resultados positivos pueden ser detectados en un tiempo menor, no obstante, debe esperarse el tiempo indicado. Por otro lado, una incubación más pro-

longada del tiempo indicado puede conducir a un cambio en la intensidad de la señal.

3. Retire los dipsticks de los tubos para leer y anote los resultados en la hoja de evaluación de resultados provista por el kit (ver capítulo Evaluación e Interpretación de Resultados) y descarte los dipsticks.

Preservar los dipsticks utilizados puede conllevar riesgo de contaminación. Además, el proceso de secado puede producir cambios en la intensidad de la señal. Por tanto, los dipsticks revelados deben ser desechados, o archivados digitalmente después de la documentación de los resultados.

Deseche los dipsticks y los tubos con el tampón sobrante en un contenedor con solución de hipoclorito al 1,5% recién preparada. Trate el área de trabajo con una solución de hipoclorito al 1,5% recién preparado y aclare con agua.

Evaluación e Interpretación de Resultados

Con cada kit se proporciona un formulario de evaluación.

Control de Conjugado (CC)

En esta zona debe desarrollarse una línea, documentando la eficiencia de la unión del conjugado y el apropiado flujo de ascenso sobre el dipstick.

Control de Amplificación (AC)

Cuando el ensayo se realiza correctamente, un amplificación control se unirá a la zona del Control de Amplificación del dipstick. Si esta banda se desarrolla, se pueden excluir inhibidores en la amplificación y errores durante la preparación y desarrollo de la reacción de amplificación.

En caso de un resultado positivo del ensayo, la señal del Control de Amplificación puede ser débil e incluso puede llegar a desaparecer completamente. Esto puede ser debido a reacciones de competencia durante la amplificación o a la presencia de una cantidad limitada de inhibidores de la amplificación. Sin embargo, en este caso, la reacción de amplificación se realizó correctamente y el ensayo no ha de ser repetido.

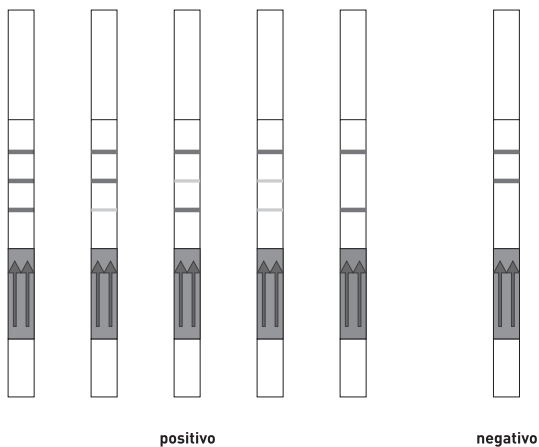
En caso de un ensayo con resultado negativo, la intensidad del AC debe ser tan fuerte como la del AC del control de contaminación. Una señal débil, o la ausencia de señal, en la banda AC en caso de un ensayo negativo, indica errores durante la amplificación,

muestra con inhibidores de amplificación, o inhibición debida a la sobrecarga del ensayo (mirar capítulo de Anomalías). En este caso, el ensayo no es válido y la muestra respectiva ha de ser repetida.

***Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB)**

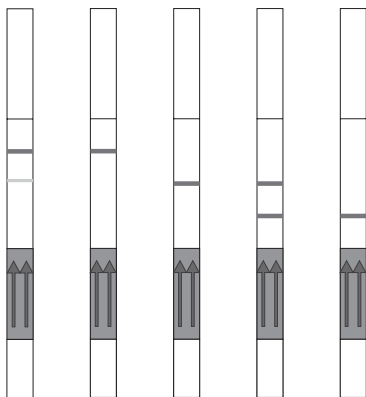
Esta zona de reacción documenta la presencia de un miembro del complejo *M. tuberculosis*. La intensidad de esta banda varía dependiendo del número de células en la muestra del paciente. En caso de una señal muy débil, la muestra respectiva debería ser repetida.

La figura de abajo muestra patrones de bandas posibles:



Nota: La intensidad de las bandas mostradas en la figura arriba indicada no representa una intensidad de banda referencial para la evaluación de resultados, sino que intenta mostrar las posibles variaciones en la intensidad de las bandas.

La figura de abajo muestra patrones de bandas que representan resultados no válidos:



no válido

Nota: La intensidad de las bandas mostradas en la figura arriba indicada no representa una intensidad de banda referencial para la evaluación de resultados, sino que intenta mostrar las posibles variaciones en la intensidad de las bandas.

Limitaciones

El ensayo ha sido validado para el su utilización con muestra clínica descontaminada. Las muestras clínicas ensayadas son esputo (inducido o por expectoración), muestras bronquiales (lavados broncoalveolares y aspirados bronquiales), secreción traqueal, jugo gástrico (únicamente en adultos) y orina. El usuario es el responsable de validar la aplicabilidad del ensayo en otro tipo de muestras.

Al igual que cualquier método de detección de DNA este sistema de ensayo detecta DNA tanto de bacterias viables como no viables. Por tanto, el ensayo **GenoQuick® MTB** no puede ser utilizado para monitorización de la progresión o el éxito del tratamiento de pacientes bajo terapia antibiótica.

La aplicación de un exceso de concentración de DNA puede conducir a una inhibición de la PCR o de la detección; por tanto, el ensayo no puede ser utilizado como un método standard para el análisis de cultivos de *Mycobacterium*.

El ensayo **GenoQuick® MTB** genera resultados cualitativos. La intensidad de la banda de MTB en el dipstick no da información acerca del número de células existentes en la muestra. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de que el número de células del organismo diana esté por debajo del límite de detección del ensayo.

Como en otros ensayos de diagnóstico, los resultados de este ensayo directo sólo pueden interpretarse por el facultativo responsable en combinación con otros datos clínicos y de laboratorio adicionales disponibles.

Antes de la amplificación, el DNA bacteriano ha de ser extraído utilizando el kit **GenoLyse®** (ver capítulos Extracción de DNA e Información para Pedidos). Ha de tenerse la seguridad de que la muestra de DNA ha sido amplificada eficientemente durante la reacción de amplificación.

El test sólo funciona dentro de los límites de las regiones genómicas para las que los primers y sondas han sido elegidos. El análisis de secuencias potenciales permanece reservado para la reanudación de investigaciones. Como cualquier sistema de detección basado en la hibridación, este sistema contempla la posibilidad de que variaciones de las secuencias en las regiones genómicas que fueron elegidas para los primers y sondas, y la detección de regiones para las cuales el kit no fue diseñado, pueden conducir a resultados falsos. Debido a la gran variabilidad de los genomas bacterianos es posible que variaciones muy raras de las especies puedan no ser detectadas. El test refleja los conocimientos de Hain Lifescience.

La utilización de este ensayo está limitada a personas calificadas, bien entrenadas en el procedimiento de utilización del ensayo y familiarizadas con métodos de biología molecular.

La evaluación de este sistema de análisis fue llevada a cabo utilizando la HotStarTaq polimerasa de Qiagen (Hilden, Alemania). Para la extracción de DNA se utilizó el kit **GenoLyse®**. Ya que las características de rendimiento de este ensayo no han sido validadas para todas las polimerasas y kits de extracción de DNA disponibles comercialmente, el usuario es el encargado de evaluar la aplicabilidad de otras polimerasas y kits de extracción de DNA distintas de las arriba mencionadas.

Los datos de rendimiento del ensayo pueden ser solicitados a través de:
www.hain-lifescience.com

Anomalías

Señal débil o ausencia de señal en todo el ensayo (incluyendo la zona de Control de Conjugado)

- Muy poco o demasiado Tampón de Migración en el tubo.
- Demasiado amplicón añadido al Tampón de Migración.
- El dipstick no fue correctamente introducido dentro del Tampón de Migración.

Ausencia de señal, o señal débil de Control de Amplificación, junto con ausencia de señal de MTB

- El amplicón no ha sido desnaturalizado ni hibridado. Repita la hibridación (ver capítulo Amplificación).
- El tiempo entre la desnaturalización y la detección fue superior a 30 minutos o las muestras fueron calentadas por encima de la temperatura ambiente. Repita la hibridación (ver capítulo Amplificación).
- No se añadió nada, o muy poca cantidad, de amplicón en el Tampón de Migración.
- La calidad de DNA aislado no permitió una amplificación eficiente. Repita la extracción de DNA y la reacción de amplificación; si fuera necesario, pruebe diferentes métodos de extracción de DNA (ver capítulo Extracción de DNA).
- Concentración del DNA utilizado para la amplificación muy alta, p.ej. debido al uso de DNA procedente de cultivo que no fue suficientemente diluido

Resultado inesperado

- Contaminación de DNA aislado y/o agentes de amplificación con DNA aislado y/o amplificado. Cuando los reactivos de amplificación están contaminados, una muestra para control de contaminación también mostrará las correspondientes bandas.
- Contaminación de los tubos vecinos por vertidos durante la adicción del amplicón.
- No se añadió nada, o muy poco DNA, a la reacción de amplificación, p.ej. debido a la ausencia o poca cantidad de células en la muestra del paciente.
- Especie bacteriana aislada no puede detectarse mediante este test.

Materiales Requeridos pero no Suministrados

- Agua destilada (para uso en biología molecular)
- Cronómetro
- DNA polimerasa termoestable con tampón (recomendación: enzima hot start, rango de extensión: 2-4 kb/min a 72°C, vida-media 10 min a 97°C, 60 min a 94°C, eficiencia de amplificación >10⁵ doble)
- Guantes desechables
- **GenoLyse**® kit (ver capítulo Información para Pedidos)
- Pipetas ajustables de 10, 20, 200, 1000 µl
- Puntas de pipeta desechables con filtro
- Solución de Hipoclorito Sódico (lejía doméstica sin colorantes ni perfumes)
- Termociclador (rango de calentamiento 3°C/seg., rango de enfriamiento 2°C/seg., precisión +/-0,2°C)
- Tubos para PCR, libres de DNasa y RNasa

Contenido del Kit

	12	96
Dipstick recubierto con sondas específicas (DS GQ MTB)	12	96
Mezcla del Primer/Nucleótido (PNM GQ MTB) contiene oligonucleótidos específicos, nucleótidos, colorante	0,5 ml	4 ml
Tampón de Migración (RB) <i>listo para usar</i> contiene tampón, <1% NaCl, <1% tensio aniónico	2 ml	16 ml
Rack de tubos para ensayo 96 tubos	1	1
Manual	1	1
Hoja de evaluación	1	4

Información Para Pedidos

GenoLyse® kit de extracción de DNA para 96 muestras

código nº 51610

GenoQuick® MTB

Teste Rápido de Genética Molecular para a Detecção Directa do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* a partir de Amostras dos Pacientes

Metodologia

O teste **GenoQuick® MTB** permite uma identificação molecular genética do complexo *M. tuberculosis* directamente a partir de amostras descontaminadas do paciente, como expectoração (indução ou expectoração), material bronquial (lavagens broncoalveolares, aspirados bronquiais), secreção traqueal, suco gástrico e urina. O produto de amplificação é qualitativamente detectado numa tira. Primeiro, os amplicons, em cadeia única, hibridizam com sondas específicas, incluídas na Mistura Primer/Nucleótido. Este complexo liga-se selectivamente ás bandas de teste na tira e é visualizado por uma marcação Ouro.

O ensaio **GenoQuick® MTB** é um teste directo para o rastreio de pacientes com uma possível infecção de tuberculose.

O procedimento completo é dividido em 3 passos: (i) Extração de DNA de amostras descontaminadas do paciente (o kit **GenoLyse®** necessário não é fornecido, ver capítulo informações para encomenda), (ii) amplificação multiplex com primers diferentemente marcados (a ADN polymerase termoestável não é fornecida) com subsequente hibridização, e (iii) detecção na tira.

Armazenamento e Precauções

Após a chegada do kit, armazene a Mistura Primer/Nucleótido (PNM) a 2-8°C, isolada de qualquer potencial fonte de ADN contaminante. Se for necessário um armazenamento longo (mais de 4 semanas), armazene a -20°C. Por forma a evitar ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, faça alíquotas da PNM. Armazene todos os restantes componentes do kit a 2-8°C. Feche bem os tubos com as tiras após cada utilização; a parede interna do tubo está coberta por dessecante. Não use os reagentes para além do seu prazo de validade. Não misture reagentes de kits com um número de lote diferente.

Os espécimes de pacientes devem ser sempre considerados como potencialmente infecciosos. As amostras de pacientes de risco devem ser sempre rotuladas e manuseadas sob condições adequadas de segurança. Observe todos os regulamentos

ambientais e de segurança federais, estaduais e locais. Use sempre luvas e roupa protectora apropriada.

Observe as precauções habituais para preparar a amplificação. É essencial que todos os reagentes e todos os materiais usados para a extracção de ADN e para a preparação da amplificação estejam livres de DNases.

Controlo da Qualidade

Por forma a validar o desempenho correcto do teste e o funcionamento apropriado dos componentes do kit, cada tira inclui 2 zonas de controlo:

- uma zona de Controlo do Conjugado, conferindo a ligação do conjugado na tira
- uma zona de Controlo de Amplificação para verificar a reacção de amplificação.

Extracção de ADN

Amostras do paciente descontaminadas como expectoração (indução ou expectoração), material bronquial (lavagens broncoalveolares, aspirados bronquiais), secreção traqueal, suco gástrico (unicamente de adultos) e urina são usadas como material inicial para a extracção de DNA. O teste não deve ser usado como método padrão para a detecção do complexo *M. tuberculosis* a partir de culturas. As amostras devem ser processadas usando o método NALC/NaOH de acordo com a publicação CDC „Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory“. A área de trabalho tem que estar livre de ADN amplificado.

Para a extracção de DNA é usado o kit **GenoLyse**[®] (extracção de DNA via lise alcalina, ver capítulo Informações para Encomenda) que é processado como descrito no manual respectivo. A avaliação de performance do **GenoQuick**[®] MTB foi efectuada usando o método descrito acima. Qualquer método de extracção alternativo tem que ser validado antes de ser usado.

Amplificação

Preparar a mistura de amplificação (45 µl) numa sala livre de ADN. A amostra de ADN deve ser adicionada numa área separada. **É crucial o uso de uma “hot start” polimerase.**

Mistura por tubo:

- 35 µl de PNM – fornecida com o kit
- 5 µl de tampão de PCR 10x – não fornecido
- x µl de solução de MgCl₂¹¹ – não fornecida
- 1-2 unidades de ADN polimerase termoestável (consultar o manual) – não fornecida
- y µl de água para obter um volume de 45 µl (não considerando o volume de enzima) – não fornecida
- Adicione 5 µl de solução de ADN, levando a um volume final de 50 µl (não considerando o volume da enzima)

¹¹ Dependendo do sistema enzima/tampão usado, a concentração óptima de MgCl₂ pode variar entre 1,5 e 4 mM. Note, por favor, que alguns tampões de incubação já possuem MgCl₂.

A avaliação do desempenho do ensaio **GenoQuick® MTB** foi realizado com a HotStarTaq DNA Polymerase da Qiagen. Quando usar esta enzima, são necessárias as seguintes quantidades por amostra:

- 35 µl de PNM – fornecida com o kit
- 5 µl de 10x Tampão de PCR Buffer para HotStarTaq (contém 15 mM MgCl₂) – não fornecido
- 5 µl 25 mM de solução de MgCl₂ – não fornecida
- 0,2 µl (1 U) HotStarTaq – não fornecida
- 5 µl de solução de ADN (adicione numa área separada).

A concentração final de MgCl₂ nesta mistura de amplificação é de 4 mM.

Determine o número de amostras a ser amplificadas (número de amostras a ser analisadas mais as amostras controlo). Uma amostra de controlo de contaminação, por exemplo, contém 5 µl de água em vez da solução de ADN. Prepare uma „master mix“ contendo todos os reagentes excepto a solução de ADN e misture bem (não use o vortex). Faça alíquotas de 45 µl para tubos de PCR.

Programa de amplificação²⁾:

15 min 95°C 1 ciclo

30 sec 95°C	}	40 ciclos
40 sec 55°C		
30 sec 72°C		

2 min 95°C 1 ciclo

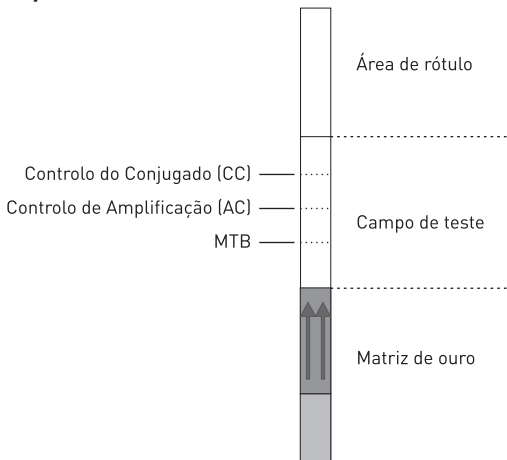
5 min 20°C 1 ciclo

(∞ 8°C)

²⁾ Aplica-se á Taq polimerase usada para validação. Com algumas ADN polimerases do tipo “hot start”, o intervalo de tempo deste primeiro passo pode ter que ser reduzido (consultar, por favor, o manual da enzima).

Os produtos de amplificação poderão ser armazenados de +8 a -20°C. Por favor note, que o produto de hibridização tem apenas uma estabilidade limitada. Deste modo, repita pelo os passos de hibridização do programa de ciclos (2 min 95°C, 5 min 20°C) se o intervalo de tempo entre a amplificação e a detecção exceder os 30 min à temperatura ambiente (15-25°C) e >1d a +8 -20°C, respectivamente.

Detecção



Nota: A tira não é exibida no tamanho original.

Preparação

Imediatamente antes de iniciar a detecção remova, uma tira para cada amostra do tubo e marque com um lápis na área de rótulo. A tira é quase completamente coberta por um revestimento transparente, deste modo, pode ser tocada na área de rótulo. Para cada amostra pipete 100 μ l de Tampão de Corrida (RB) para um tubo do rack de teste fornecido.

1. Adicione 10 μ l dos amplicons hibridizados a um tubo com 100 μ l de RB e misture bem pipetando para cima e para baixo.

A cor do RB vai mudar para amarelo pálido após a adição dos amplicons.

2. Coloque a tira com a matriz de ouro virada para baixo (seta viradas para cima) no tubo respectivo e incube durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Os resultados positivos podem ser detectados antes, no entanto o tempo indicado deve ser respeitado. Um tempo de incubação alongado pode, por outro lado levar a alterações da intensidade do sinal.

3. Remova as tiras dos tubos e registe os resultados na ficha de avaliação fornecida (ver capítulo Avaliação e Interpretação dos Resultados) descarte as tiras.

A preservação das tiras acarreta riscos de contaminação e, adicionalmente o processo de secagem pode causar alterações na intensidade de sinal. Deste modo as tiras reveladas devem ser descartadas ou arquivadas digitalmente após o registo dos resultados.

Descarte as tiras e os tubos com o tampão restante para um contentor com 1,5% de solução fresca de hipoclorito de sódio e descarte as luvas. Limpe a área de trabalho com 1,5% de solução fresca de hipoclorito de sódio e passe por água.

Avaliação e Interpretação dos Resultados

Uma ficha de avaliação é fornecida com o kit.

Controlo do Conjugado (CC)

Tem que haver desenvolvimento de uma linha nesta zona, documentando a eficiência da ligação do conjugado e o fluxo adequado na tira.

Controlo de Amplificação

Quando o teste é realizado correctamente o amplicon de controlo vai-se ligar à zona de Controlo de Amplificação na tira. O desenvolvimento desta banda exclui o transporte de inibidores da amplificação e erros durante a preparação e realização da reacção de amplificação.

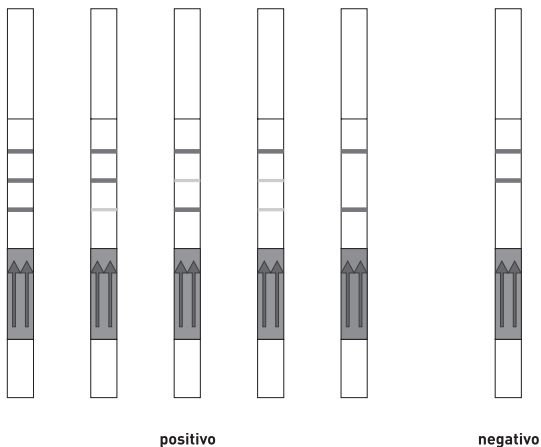
No caso de um resultado positivo, o sinal da zona de Controlo de Amplificação pode ser fraco ou mesmo desaparecer. Isto pode-se dever a reacções de competição durante a amplificação ou à presença de uma quantidade limitada de inibidores de amplificação. No entanto, neste caso a reacção de amplificação foi realizada correctamente e o teste não precisa de ser repetido.

No caso de um resultado de teste negativo, a intensidade do AC deve ser igual ou superior ao AC do controlo de contaminação. Uma banda fraca ou ausente no caso de um resultado de teste negativo indica erros durante a preparação da amplificação, transporte de inibidores de amplificação, ou inibição devido a sobrecarga do sistema de teste (ver capítulo Resolução de Problemas). Neste caso, o teste não é válido e a amostra respectiva tem que ser repetida.

Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)

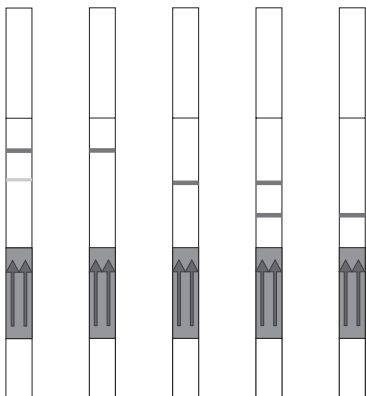
Esta zona de reacção documenta a presença de um membro do complexo *M. tuberculosis*. A intensidade desta banda varia dependendo do numero de células na amostra do paciente. No caso de um sinal muito fraco, a respectiva amostra deve ser repetida.

A figura abaixo mostra os possíveis padrões de bandas válidos:



Nota: A intensidade das bandas apresentadas nas figuras acima, não fornecem uma referência da intensidade do sinal para avaliação dos resultados, mas pretendem dar uma impressão das várias intensidades de bandas possíveis.

A figura abaixo mostra possíveis padrões de bandas que representam resultados inválidos:



inválido

Nota: A intensidade das bandas apresentadas nas figuras acima, não fornecem uma referência da intensidade do sinal para avaliação dos resultados, mas pretendem dar uma impressão das várias intensidades de bandas possíveis.

Limitações

O teste foi validado para uso de material directo do paciente descontaminado. As amostras clínicas testadas foram expectoração (indução ou expectoração), material bronquial (lavagens broncoalveolares, aspirados bronquiais), secreção traqueal, suco gástrico (unicamente de adultos) e urina. O utilizador é responsável pelo teste da aplicabilidade deste ensaio para outros materiais de amostras.

Como qualquer método de detecção de DNA este sistema de teste detecta DNA de bactérias viáveis e não viáveis. Deste modo, o teste **GenoQuick® MTB** não deve ser usado para monitorizar a progressão ou sucesso do tratamento de pacientes com terapia antimicrobiana.

O uso de excesso de ADN pode levar a inibição da PCR ou da detecção, deste modo o teste não deve ser usado como método padrão para examinar culturas de *Mycobacterium*.

O teste **GenoQuick® MTB** gera resultados qualitativos. A intensidade da banda MTB na tira não fornece informação sobre o número de células na amostra. Um resultado de teste negativo não exclui a possibilidade de que o número de células do organismo alvo esteja abaixo do limite de detecção do teste.

Tal como com outros testes de diagnóstico, os resultados deste teste directo podem ser apenas interpretados em combinação com dados laboratoriais e clínicos adicionais disponibilizados ao médico responsável.

Antes da amplificação, o DNA bacteriano tem que ser extraído usando o kit **GenoLyse®** (ver capítulo Extração de DNA e Informações para Encomenda). Deve-se assegurar que o ADN modelo é eficientemente amplificado durante a reacção de amplificação.

O teste funciona apenas dentro dos limites das regiões genómicas para que foram escolhidos os primers e as sondas. Uma potencial análise de sequência permanece reservada para o prosseguimento das investigações. Tal como qualquer sistema de detecção baseado na hibridização este sistema comporta a possibilidade de que variações de sequência das regiões genómicas para que os primers e as sondas foram escolhidas, para as quais a detecção do teste não foi desenhada, possam levar a resultados falsos. Devido à variabilidade elevada dos genomas bacterianos é possível que variações muito raras nas espécies não sejam detectadas. O teste reflecte o estado de conhecimento da Hain Lifescience.

Este teste deve ser executado por pessoal bem treinado no procedimento de teste e familiarizado com métodos de biologia molecular.

O desempenho da avaliação deste sistema de teste foi realizado utilizando a HotStarTaq polymerase da Qiagen (Hilden, Alemanha). Para a extração de DNA foi usado o kit **GenoLyse®**. Uma vez que as características do desempenho deste ensaio não foram validadas para todas as polimerases e kits de isolamento de ADN disponíveis comercialmente, o utilizador é responsável pela validação da aplicabilidade de outras polimerases ou métodos de isolamento.

Os dados de avaliação do ensaio podem ser pedidos a partir de:

www.hain-lifescience.com

Resolução de Problemas

Sinais globalmente fracos ou inexistência de sinais (incluindo a zona de Controlo do Conjugado)

- Excesso ou carência de Tampão de Corrida adicionado ao tubo.
- Excesso de amplicons adicionados ao Tampão de Corrida.
- As tiras não foram correctamente submersas no Tampão de Corrida.

Ausência ou Controlo de Amplificação fraco sem o sinal do MTB presente.

- Os amplicons não foram desnaturados e hibridizados. Repetir a hibridização (ver capítulo Amplificação).
- Tempo entre a desnaturação e a detecção superior a 30 minutos ou as amostras foram aquecidas acima da temperatura ambiente. Repetir hibridização (ver capítulo Amplificação).
- Ausência ou quantidade demasiado pequena de amplicons adicionados ao Tampão de Corrida.
- A qualidade do ADN isolado não permite uma amplificação eficiente. Repetir o isolamento de ADN e a reacção de amplificação; se necessário, usar um método diferente para o isolamento do ADN (ver capítulo Isolamento de ADN).
- Concentração de ADN usado para a amplificação demasiado elevada, por exemplo devido ao uso de DNA de uma cultura pouco diluída

Resultados inesperados

- Contaminação do ADN isolado e/ou dos agentes de amplificação com ADN isolado e/ou amplificado. Quando os reagentes de amplificação estão contaminados, uma amostra de controlo de contaminação vai mostrar também o respectivo padrão de bandas.
- Contaminação dos tubos vizinhos por salpicos durante a adição do amplicon.
- Ausência ou quantidade demasiado pequena de ADN adicionada à reacção de amplificação, ex, ausência ou poucas células na amostra do paciente.
- A espécie bacteriana isolada não pode ser detectada por este teste.

Materiais Necessários mas não Fornecidos

- ADN polimerase termoestável com tampão (recomendação: enzima "hot start", taxa de extensão: 2-4 kb/min a 72°C, meia-vida: 10 min a 97°C, 60 min a 94°C, eficiência de amplificação: >10⁵ vezes)
- Água (para uso em biologia molecular)
- Cronómetro
- **GenoLyse**® kit (ver capítulo Informações Para Encomenda)
- Luvas descartáveis
- Pipetas ajustáveis para 10, 20, 200, e 1000 µl
- Pontas de pipeta descartáveis, estéreis e com filtro
- Solução de hipoclorito de sódio (lixívia caseira sem cor e cheiro)
- Termociclador (taxa de aquecimento 3°C/sec, taxa de arrefecimento 2°C/sec, precisão +/-0,2°C)
- Tubos para termociclador; livres de DNases e RNases

Conteúdo do Kit

	12	96
Tiras cobertas com sondas específicas (DS GQ MTB)	12	96
Mistura Primer/Nucleótido (PNM GQ MTB) contém oligonucleotidos específicos, nucleótidos, corante	0,5 ml	4 ml
Tampão de Corrida (RB) pronto a usar contém tampão, <1% NaCl, <1% tensoactivos aniónicos	2 ml	16 ml
Rack de teste com 96 tubos	1	1
Manual	1	1
Ficha de avaliação	1	4

Informações Para Encomenda

GenoLyse® kit de extracção de ADN para 96 amostras

Ref. nº 51610

HAIN
LIFESCIENCE



Hain Lifescience GmbH

Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany

www.hain-lifescience.de

REF

318

12

31896

96