

GenoType MTBC

VER 1.X

Notice d'Utilisation

IFU-301-09

CE

IVD pour usage diagnostique in vitro uniquement

GenoType MTBC

Test Génétique de Différentiation du Complexe *Mycobacterium tuberculosis* après Culture

Veuillez lire attentivement la notice d'utilisation dans sa totalité avant d'utiliser le kit. Respecter strictement la procédure établie pour obtenir des résultats de tests optimaux.

Domaine d'Utilisation

Le test **GenoType MTBC** est un test qualitatif de diagnostic in vitro à partir de cultures pour la différenciation génétique des espèces/souches appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis*, à savoir : *M. tuberculosis*/*M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae* et *M. bovis* BCG.

Le test est indiqué comme une aide au diagnostic et destiné à être utilisé dans les établissements médicaux et les laboratoires cliniques.

Résumé et Explication

La tuberculose (TB) est une maladie infectieuse d'origine bactérienne transmise par voie aérienne, par l'intermédiaire de gouttelettes infectées. En 2010, on estimait à 8,8 millions le nombre de cas de tuberculose à travers le monde, et à 1,1 millions le nombre de décès [1].

Les agents pathogènes de la tuberculose sont des bacilles acido-alcoolo-résistants, aérobies stricts, immobiles, appartenant à la famille des *Mycobacteriaceae*. Ils sont Gram-positifs avec une teneur élevée en G+C (59-66%). Le genre *Mycobacterium* comprend de nombreuses espèces, dont les mycobactéries atypiques (NTM) et le complexe MTB responsable de la tuberculose incluant les espèces *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, et *M. canettii*. L'espèce *M. bovis* comprend la sous-espèce *M. bovis* subsp. *bovis* résistante à la pyrazinamide, la sous-espèce *M. bovis* subsp. *caprae* sensible à la pyrazinamide, et la souche vaccinale *M. bovis* BCG non tuberculeuse.

GenoType MTBC permet la détection directe et fiable du complexe *M. tuberculosis* et par conséquent l'application rapide de mesures thérapeutiques spécifiques.

Principes de la Procédure

Le test **GenoType MTBC** est basé sur la technique **DNA•STRIP**. La procédure complète comporte trois phases : (i) extraction de l'ADN à partir de cultures (bactéries cultivées en milieu solide ou liquide; réactifs requis pour l'extraction de l'ADN non fournis), (ii) une amplification multiplex à l'aide d'amorces biotinylées, et (iii) hybridation inverse.

Tous les réactifs requis pour l'amplification tels que polymérase et amorces sont inclus dans les Mélanges d'Amplification A et B (AM-A et AM-B) et sont optimisés pour ce test. Les bandelettes sont recouvertes de sondes spécifiques complémentaires aux acides nucléiques amplifiés. Après la dénaturation chimique, les amplicons simple brin se lient aux sondes (hybridation). Sous l'action de conditions stringentes causées par la nature du tampon et une température définie, les molécules d'ADN simple brin se lient spécifiquement à leur brin complémentaire. Ainsi, les sondes discriminent de façon fiable les différentes séquences des espèces bactériennes. Le conjugué streptavidine-phosphatase alcaline est immobilisé sur la membrane par l'intermédiaire de la biotine présente sur chaque amplicon. Enfin, la phosphatase alcaline transforme un substrat ajouté en colorant qui forme un précipité coloré sur la bandelette. Les signaux obtenus sont facilement et rapidement interprétés à l'aide d'une matrice fournie avec chaque kit.

Conservation et Élimination des Réactifs

1/2 Composant du Kit 1 de 2

2/2 Composant du Kit 2 de 2

Conserver tous les Composants du Kit 1 à 2-8°C. Conserver tous les Composants du Kit 2 à -20°C et strictement séparés d'ADN contaminant. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date de péremption. Éliminer les réactifs inutilisés et les déchets conformément aux réglementations locales, régionales et nationales.

Précautions de Manipulation des Composants de la Trousse

Suivre les recommandations (fédérale, nationale, locale) d'hygiène, de sécurité et d'environnement. Se protéger à l'aide de vêtements adéquats et de gants.

Lors de la manipulation du kit, tenir compte des indications de sécurité suivantes :

La **Solution de Dénaturation** (DEN) contient du NaOH (<2%) et est irritante pour la peau et les yeux (R36/38 et S26-37/39-45).

Le **Substrat Concentré** (SUB-C) contient du diméthyl sulfoxyde et est irritant (R36/37/38, S23-26-36).

Pour des informations supplémentaires, consulter les fiches de sécurité, qui peuvent également être téléchargées à l'adresse suivante :

www.hain-lifescience.com/products/msds.html

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 (CC) pour contrôler la fixation du conjugué sur la bandelette et le bon déroulement de la révélation chromogénique
- une zone de Contrôle Universel (UC) qui détecte, au vu des connaissances actuelles, toutes les espèces de Mycobactéries ainsi que les bactéries gram-positives riches en G+C

Observer les précautions usuelles pour la préparation de l'amplification. Tous les matériels (tels qu'embouts de pipettes) en contact avec les réactifs doivent impérativement être exempts de DNases.

Un contrôle négatif pour la détection d'une possible contamination contenant de l'eau (niveau de pureté pour Biologie Moléculaire) au lieu d'ADN doit être réalisé avec chaque série de tests ; seule la bande CC devrait se développer sur la bandelette correspondante.

Echantillons

L'ADN peut être extrait à partir de bactéries cultivées en milieu solide (ex : Loewenstein-Jensen, Middlebrook) ou en milieu liquide (ex : BACTEC, MB-Check). Ce test ne doit pas être utilisé à des fins de détection directement à partir d'échantillons de patients.

Précautions de manipulation des échantillons

Les échantillons, prélevés sur patient ou à partir de culture doivent toujours être considérés comme potentiellement infectieux et être manipulés comme tels (ex. voir [2] ou [3]). Se protéger à l'aide de vêtements adéquats et de gants. Les échantillons et les cultures provenant de patients à risque (infectés par des micro-organismes pathogènes incluant l'Hépatite B et le Virus d'Immunodéficience humaine (VIH) doivent toujours être étiquetés et manipulés dans des conditions de sécurité adaptées conformément aux directives institutionnelles.

Le traitement et la préparation des échantillons, jusqu'à l'étape d'inactivation par la chaleur, doivent être opérés dans une enceinte de sécurité biologique de classe II. Préalablement à l'étape d'inactivation par la chaleur, les échantillons doivent être centrifugés dans une enceinte de sécurité biologique de classe II ou dans un rotor étanche aux aérosols. Ouvrir le rotor étanche aux aérosols uniquement dans une enceinte de sécurité biologique. Après l'étape d'inactivation par la chaleur, un rotor standard peut être utilisé pour la centrifugation des échantillons en dehors d'un environnement sécurisé. Éliminer les embouts de pipettes immédiatement après usage dans un contenant pour déchets à risques biologiques. Après avoir terminé le test, éliminer tous les consommables dans un contenant pour déchets à risques biologiques.

Conservation et transport

Tous les échantillons doivent être prélevés et transportés selon la publication du CDC « Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory » [4], le manuel « Clinical Microbiology Procedures Handbook » [5], ou votre manuel de procédures de laboratoire.

Jusqu'à la phase de décontamination, les échantillons doivent être conservés dans des containers stériles et conservés à 2-8°C. Le transport des échantillons à température ambiante doit être réalisé dès que possible, dans un délai d'un à deux jours maximum. Les échantillons utilisés pour la décontamination ne doivent pas dater de plus de 4 jours.

Préparation

Les échantillons cliniques doivent être traités par NALC/NaOH selon la publication du CDC « Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory » [4]. Après décontamination, le culot cellulaire doit être remis en solution dans max. 1 à 1,5 ml de tampon phosphate. Un volume plus important peut affecter la sensibilité du test.

Le traitement et la préparation des échantillons, jusqu'à l'étape d'inactivation par la chaleur, doivent être opérés dans une enceinte de sécurité biologique de classe II.

Extraction de l'ADN

L'ADN peut être extrait à partir de bactéries cultivées en milieu solide (ex : Loewenstein-Jensen, Middlebrook) ou en milieu liquide (ex : BACTEC, MB-Check). L'espace de travail doit être exempt de toute trace d'ADN contaminant.

Le protocole rapide suivant peut être utilisé pour l'extraction d'ADN à partir de cultures :

- 1a. A partir de bactéries cultivées en milieu solide : à l'aide d'une oeuze standard, prélever quelques colonies et les mettre en suspension dans approximativement 300 µl d'eau (niveau de pureté pour Biologie Moléculaire).
- 1b. A partir de bactéries cultivées en milieu liquide : Prélever directement 1 ml de milieu. Centrifuger pendant 15 minutes à 10 000 x g sur une centrifugeuse de paillasse à l'aide d'un rotor étanche aux aérosols dans une enceinte de sécurité biologique de classe II. Jeter le surnageant et reprendre le culot par 100-300 µl d'eau (niveau de pureté pour Biologie Moléculaire). Vortexer.
2. Après les phases 1a ou 1b, incuber les bactéries 20 min à 95°C dans le bain-marie.
3. Soniquer pendant 15 minutes dans un bain à ultrasons.
4. Centrifuger 5 minutes à vitesse maximale. Utiliser directement 5 µl de surnageant pour la PCR. Si la solution d'ADN doit être conservée de façon prolongée, transférer le surnageant dans un nouveau tube.

Le test présent a aussi été validé avec le kit **GenoLyse**[®] (consulter chapitre Commandes) qui peut être utilisé alternativement à la méthode décrite en haut pour l'isolation d'ADN. Veuillez consulter la notice d'utilisation du **GenoLyse**[®] pour de plus amples informations.

La performance du test **GenoType MTBC** a été évaluée à l'aide des méthodes décrites ci-dessus. Jusqu'à la présente version de cette notice d'utilisation, la performance du test n'a pas été validée avec d'autres méthodes d'extraction d'ADN ou types d'échantillons.

Amplification

Tous les réactifs requis pour l'amplification tels que polymérase et amorces sont inclus dans les Mélanges d'Amplification A et B (AM-A et AM-B) et sont optimisés pour ce test. Après décongélation, homogénéiser soigneusement AM-A et AM-B. Pipeter AM-A et AM-B dans une pièce exempte d'ADN contaminant. L'échantillon d'ADN doit être ajouté dans une zone séparée.

Préparer pour chaque échantillon :

- 10 µl AM-A (voir Composant du Kit 2)
- 35 µl AM-B (voir Composant du Kit 2)
- 5 µl de solution d'ADN

Volume final : 50 µl

Déterminer le nombre d'échantillons à amplifier (nombre d'échantillons à analyser + contrôles). Préparer le nombre de tubes requis. Préparer une solution mère de mélange réactionnel contenant AM-A et AM-B, et homogénéiser avec soin mais complètement (ne pas vortexer). Il est également possible de transférer la totalité du contenu d'un tube de mélange réactionnel AM-A dans un tube de mélange réactionnel AM-B. On obtient ainsi du mélange réactionnel (0,68 ml) pour 12 réactions d'amplification (kit de 12 tests), ou 4x 1,35 ml pour 4x 24 réactions d'amplification (kit de 96 tests). Aliquoter 45 µl du mélange réactionnel dans les tubes de PCR et ajouter 5 µl d'eau (niveau de pureté pour Biologie Moléculaire) à un aliquot (contrôle négatif). Dans une zone séparée, ajouter 5 µl d'ADN à chaque aliquot (excepté pour le contrôle négatif). Veuillez noter que le mélange réactionnel doit être préparé fraîchement à chaque fois.

Profil d'amplification :

Lorsqu'un thermocycleur de Hain Lifescience est utilisé avec la préinstallation correspondante, sélectionner le protocole « HOT 30 ».

15 min 95°C	1 cycle
30 sec 95°C } 2 min 58°C }	10 cycles
25 sec 95°C } 40 sec 53°C } 40 sec 70°C }	20 cycles
8 min 70°C	1 cycle

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

Hybridation

Lorsqu'un automate d'hybridation de Hain Lifescience est utilisé, se référer au document « Overview equipment programs » sur le site www.hain-lifescience.com, pour obtenir le nom du protocole d'hybridation préinstallé à utiliser.

Le protocole suivant décrit la procédure d'hybridation manuelle à l'aide d'un bain-marie ou du **TwinCubator**.

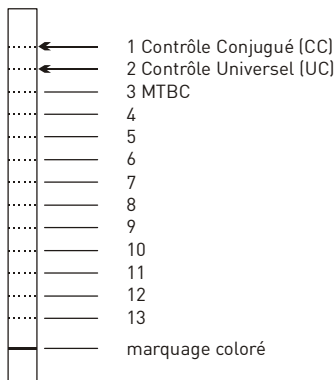
Préparation

Préchauffer le bain-marie agitateur à **45°C** (dérivation maximum : +/-1°C) ou mettre en marche le **TwinCubator**. Préchauffer les solutions HYB et STR à 37-45°C avant utilisation. Les réactifs ne doivent présenter aucun précipité (à noter cependant que la solution CON-D est opaque). Si besoin, agiter. Équilibrer les autres réactifs (à l'exception des solutions CON-C et SUB-C) à température ambiante. Dans un tube approprié, diluer le Conjugué Concentré (CON-C, orange) et le Substrat Concentré (SUB-C, jaune) au 1:100 dans un volume adéquat du tampon correspondant (**CON-C avec CON-D, SUB-C avec SUB-D**). Bien homogénéiser et équilibrer à température ambiante. Pour chaque échantillon testé, ajouter 10 µl de concentré à 1 ml de tampon. Diluer CON-C avant chaque utilisation. Une fois dilué, SUB-C reste stable pendant 4 semaines conservé à température ambiante et à l'obscurité.

1. **Déposer 20 µl de Solution de Dénaturation (DEN, bleu) à une extrémité de chaque puits utilisé.**
2. **Ajouter 20 µl d'échantillon amplifié et mélanger les deux solutions par pipetages répétés. Incuber 5 minutes à température ambiante.**
Pendant ce temps, à l'aide d'une pince, sortir du tube le nombre approprié de bandelettes (STRIPS), et inscrire au crayon leur numéro d'identification dans l'espace situé sous le marquage coloré. Toujours porter des gants pour manipuler les bandelettes.
3. **Ajouter dans chaque puits 1 ml de Tampon d'Hybridation (HYB, vert) préchauffé et homogénéisé. Doucement agiter le bac jusqu'à ce que le mélange devienne une coloration homogène.**
Éviter les éclaboussures vers les autres puits.
4. **Déposer une bandelette dans chaque puits utilisé.**
Les bandelettes doivent être entièrement recouvertes par le liquide, avec la face sensibilisée (identifiable par le marquage coloré) tournée vers le haut. Les bandelettes mal orientées doivent être remises en position à l'aide de pincettes propres. Afin d'éviter toute contamination, bien nettoyer les pincettes après chaque utilisation. Cela vaut aussi pour toutes les étapes suivantes.
5. **Placer le bac dans le bain-marie agitateur/TwinCubator et incuber 30 minutes à 45°C.**
Pour le bain-marie agitateur sélectionner une fréquence d'agitation suffisante pour assurer un bon brassage du tampon. Ajuster le niveau de l'eau dans le bain-marie agitateur au moins à un tiers de la hauteur du bac de façon à assurer un bon transfert de chaleur. Cela vaut aussi pour toutes les étapes suivantes.
6. **Aspirer le Tampon d'Hybridation.**
Utiliser par exemple une pipette pasteur reliée à une pompe à vide.
7. **Ajouter à chaque puits 1 ml de Solution de Lavage Stringent (STR, rouge) et incuber 15 minutes à 45°C dans le bain-marie agitateur/TwinCubator.**
8. **À partir de cette étape, travailler à température ambiante.**
Éliminer la Solution de Lavage Stringent.
Vider la Solution de Lavage Stringent dans un container à déchets. Éliminer tout le liquide résiduel en retournant le bac sur du papier absorbant (effectuer de même pour les autres étapes de lavage).
9. **Laver chaque puits avec 1 ml de Solution de Rinçage (RIN) et incuber pendant 1 minute sous agitation (TwinCubator/plateau agitateur). Vider la Solution de Rinçage.**
10. **Ajouter à chaque puits 1 ml de Conjugué dilué (voir ci-dessus) et incuber 30 minutes sous agitation (TwinCubator/plateau agitateur).**
11. **Vider le contenu des puits et rincer sous agitation 1 minute à l'aide de 1 ml de Solution de Rinçage (RIN). Vider RIN. Répéter ce rinçage une nouvelle fois, puis rincer une fois avec environ 1 ml d'eau distillée à l'aide d'une pissette.**
Bien éliminer toute trace d'eau dans les puits après cette dernière étape.
12. **Ajouter 1 ml de Substrat dilué (voir ci-dessus) dans chaque puits et incuber sans agitation à l'obscurité.**
Le temps de révélation (le temps requis pour que les lignes colorées soient clairement visibles) peut varier en fonction des conditions de déroulement du test (de 3 à 20 minutes), notamment de la température de la pièce. Des temps de révélation trop longs peuvent entraîner un bruit de fond qui peut gêner l'interprétation des résultats.
13. **Arrêter la réaction dès que les lignes colorées sont clairement visibles en rinçant brièvement deux fois à l'eau distillée.**
14. **À l'aide de pincettes, récupérer les bandelettes et les sécher entre deux couches de papier absorbant.**

Évaluation et Interprétation des Résultats

Classer et ranger les bandelettes à l'abri de la lumière. Une feuille d'évaluation est fournie avec le kit. Utilisation de la feuille d'évaluation : coller les bandelettes dans leur emplacement réservé, en alignant les bandes CC et UC des bandelettes avec les bandes CC et UC de la feuille. Noter les bandes positives dans l'avant-dernière colonne, et déterminer l'espèce correspondante à l'aide du tableau d'interprétation. Noter le résultat dans la dernière colonne. La matrice permet également d'évaluer les résultats en alignant de la même façon les bandes CC et UC des bandelettes et de la matrice. Chaque bandelette comprend 13 zones réactionnelles (voir figure).



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

Contrôle Conjugué (CC)

Une ligne colorée doit se développer dans cette zone. Cette ligne témoigne de la bonne fixation du conjugué et du bon déroulement de la révélation.

Contrôle Universel (UC)

Au vu des connaissances actuelles, cette zone s'hybride avec toutes les mycobactéries connues ainsi que les bactéries gram-positives riches en G+C. Lorsque cette zone et la zone Contrôle Conjugué développent une ligne colorée alors que le reste du profil ne permet pas d'identifier spécifiquement une espèce mycobactérienne, celle-ci doit être identifiée par une méthode supplémentaire.

MTBC

Au vu des connaissances actuelles, cette zone s'hybride avec les amplicons générés à partir de tous les membres connus du complexe *Mycobacterium tuberculosis*.

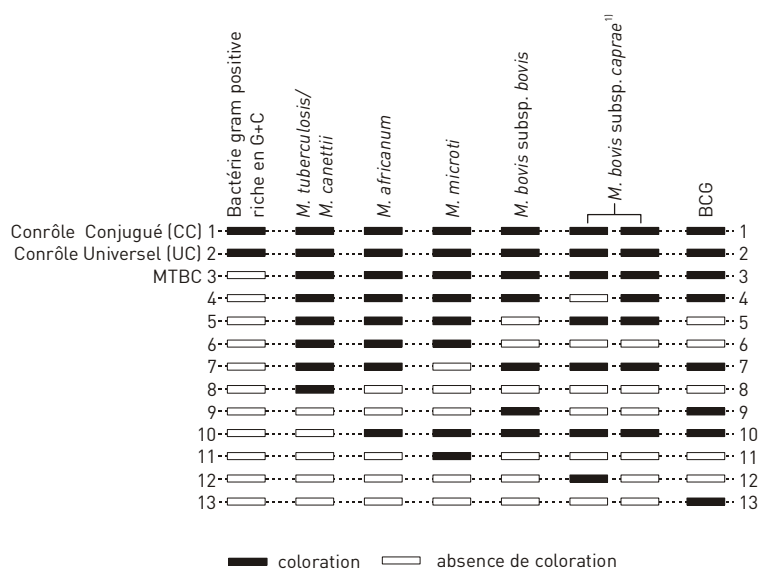
Autres bandes

Sondes spécifiques ; utiliser le tableau d'interprétation pour l'évaluation des résultats.

Toutes les lignes d'une même bandelette peuvent ne pas présenter la même intensité. Seules les lignes colorées d'intensité environ égale ou supérieure à celle du Contrôle Universel doivent être prises en compte pour l'interprétation.

Lorsqu'une quantité importante d'amplicons a été utilisée pour l'hybridation, d'autres bandes peuvent occasionnellement apparaître (voir chapitre Causes d'Erreurs).

Tableau d'Interprétation



¹⁾ Approximativement 5% de la sous-espèce *M. bovis caprae* présente le profil décrit dans la colonne de droite.

Limitations

Respecter scrupuleusement les protocoles et procédures établis afin d'obtenir des résultats optimaux et d'éliminer tout risque de contamination.

Le test fonctionne dans les limites de la région du génome choisie pour les amorces et les sondes.

La présence de différentes espèces bactériennes dans un même échantillon peut entraver l'interprétation du test.

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 l'extrême variabilité des génomes bactériens, il est possible que certains sous-types puissent ne pas être détectés. 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.

Les performances du test ont été évaluées par des méthodes d'extraction d'ADN à partir d'échantillons de cultures décrites au chapitre Extraction de l'ADN. Jusqu'à la présente version de cette notice d'utilisation, la performance du test n'a pas été validée avec d'autres méthodes d'extraction d'ADN ou types d'échantillons.

Les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés en tenant compte de toute autre donnée de laboratoire ou clinique à la disposition du médecin responsable.

Causes d'Erreurs

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

- Température ambiante trop basse ou réactifs mal équilibrés.
- CON-C et/ou SUB-C n'a pas été ajouté ou était utilisé trop dilué.

La phase d'hybridation inverse doit être répétée.

Résultats faibles ou absence de signal, excepté dans la zone de Contrôle Conjugué

- La qualité de l'ADN extrait n'a pas permis une amplification correcte. Recommencer l'extraction.
- Les Mélanges d'Amplification [AM-A et AM-B] ont été inversés, ajoutés en quantité inadéquate ou mal homogénéisés. Préparer un nouveau mélange réactionnel et recommencer le test.
- Température d'incubation trop élevée. La phase d'hybridation inverse doit être répétée.
- L'espèce bactérienne isolée ne peut pas être identifiée par le Contrôle Universel. Utiliser une méthode d'identification alternative.

Coloration non homogène

- Les bandelettes n'ont pas été suffisamment immergées lors des différentes incubations.
- Le bac n'a pas été correctement agité.

La phase d'hybridation inverse doit être répétée.

Bruit de fond important

- CON-C et/ou SUB-C utilisé(s) trop concentré(s).
- Les étapes de lavage n'ont pas été correctement effectuées.
- Les solutions de lavage étaient trop froides lors de leur utilisation.

La phase d'hybridation inverse doit être répétée.

Résultat inattendu

- Fausse température d'incubation.
 - Solution d'Hybridation et/ou Solution de Lavage Stringent incorrectement équilibrées ou homogénéisées.
 - Contamination des puits voisins par des éclaboussures lors de l'addition de la Solution d'Hybridation.
- La phase d'hybridation inverse doit être répétée.**
- Contamination de l'ADN extrait avec de l'ADN précédemment extrait ou amplifié. Recommencer l'extraction.
 - Contamination des réactifs d'amplification. Dans ce cas, un échantillon de contrôle négatif développe des bandes additionnelles en plus de CC. Recommencer l'amplification en utilisant des réactifs fraîchement préparés.
 - Dans certaines conditions du test, une forte concentration d'ADN amplifié peut entraîner une réaction chromogénique très rapide. En pareil cas, afin de prévenir le développement de bandes dues à des réactions d'hybridation croisées, arrêter la réaction chromogénique dès que les premières lignes colorées deviennent visibles.
 - Matériel de départ constitué d'une culture non pure. Faire une nouvelle culture afin d'exclure une contamination.
 - Erreur durant l'extraction d'ADN. Recommencer l'extraction.
 - L'espèce bactérienne isolée ne peut pas être identifiée avec ce test. Utiliser des méthodes de détection additionnelles.

Matériel Requis mais Non Fourni

- Bain à ultrasons
- Bain-marie
- Bain-marie agitateur + plateau agitateur **ou** TwinCubator (instrument pour hybridation manuelle) **ou** automate d'hybridation
- Centrifugeuse de paillasse, si possible avec rotor étanche aux aérosols
- Chronomètre
- Embouts de pipettes stériles avec filtre
- Epruvette graduée
- Eau (niveau de pureté pour Biologie Moléculaire)
- Enceinte de sécurité biologique de classe II
- Gants à usage unique
- Microtubes pour PCR ; exempts de contamination par DNase et RNase
- Papier absorbant
- Pincettes
- Pipettes réglables pour 10, 20, 200 et 1000 µl
- Réactifs de décontamination des échantillons et équipement nécessaire
- Réactifs pour l'extraction de l'ADN ainsi que les appareils associés
- Thermocycleur (taux de chauffage : 3°C/sec, taux de refroidissement : 2°C/sec, précision : +/-0,2°C)

Composition du Kit

réf	301	30196
tests	12	96
Composant du Kit 1 sur 2 (conserver à 2-8°C)		
Bandelettes sensibilisées avec les sondes spécifiques (MTBC STRIPS)	12	2x 48
Solution de Dénaturation (DEN) contient <2% NaOH, colorant	0,3 ml	2x 1,2 ml
Solution d'Hybridation (HYB) contient 8-10% de détergent anionique, colorant	20 ml	120 ml
Solution de Lavage Stringent (STR) contient >25% d'un sel d'ammonium quaternaire, <1% détergent anionique, colorant	20 ml	120 ml
Solution de Rinçage (RIN) contient du tampon, <1% NaCl, <1% de détergent anionique	50 ml	3x 120 ml
Conjugué Concentré (CON-C) contient de la phosphatase alcaline conjuguée à la streptavidine, colorant	0,2 ml	1,2 ml
Tampon Conjugué (CON-D) contient du tampon, 1% agent bloquant, <1% NaCl	20 ml	120 ml
Substrat Concentré (SUB-C) contient du dimethyl sulfoxyde, solution substrat	0,2 ml	1,2 ml
Tampon Substrat (SUB-D) contient du tampon, <1% MgCl ₂ , <1% NaCl	20 ml	120 ml
Bac, feuille d'évaluation	1 de chaque	4 de chaque
Notice d'utilisation, matrice	1 de chaque	1 de chaque

Composant du Kit 2 sur 2

 (conserver à -20°C)

Mélange d'Amplification A (AM-A GT MTBC) contient du tampon, amorces spécifiques, nucléotides, Taq polymérase	0,15 ml	4x 0,3 ml
Mélange d'Amplification B (AM-B GT MTBC) contient du tampon, sels, colorant	0,53 ml	4x 1,05 ml

Commandes

	réf
GenoType MTBC (kit pour l'analyse de 12 échantillons)	301
GenoType MTBC (kit pour l'analyse de 96 échantillons)	30196
GenoLyse® (kit d'extraction manuelle d'ADN pour 12 échantillons)	51612
GenoLyse® (kit d'extraction manuelle d'ADN pour 96 échantillons)	51610

Performance Characteristics

Diagnostic performance

DNA Extraction with quick method

Diagnostic performance characteristics were determined in a study with 82 clinical isolates grown on solid medium [6] and 77 clinical isolates grown in liquid medium [7]. DNA extraction was performed using the quick method described in chapter DNA Extraction. The **GenoType MTBC** was compared to various biochemical and molecular differentiation methods (e.g. determination of colony morphology, nitrate reduction on modified Dubos broth, niacin accumulation test, growth in the presence of thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TCH), spoligotyping, and RD1-PCR).

In the first study, 82 clinical isolates grown on **solid medium** were analyzed [6]. For all samples, the **GenoType MTBC** results were in agreement with the results of the biochemical or molecular differentiation (see table 1).

Table 1: Results of the *M. tuberculosis* complex differentiation [bacteria grown on solid medium; DNA extraction with quick method]

result GenoType MTBC	number of isolates	result conventional methods	
<i>M. tuberculosis</i>	31	31 <i>M. tuberculosis</i>	diagnostic sensitivity: 100% diagnostic specificity: 100% positive predictive value: 100% negative predictive value: 100%
<i>M. africanum</i>	4	4 <i>M. africanum</i>	
<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>	17	17 <i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>	
<i>M. bovis</i> subsp. <i>caprae</i>	17	17 <i>M. bovis</i> subsp. <i>caprae</i>	
<i>M. bovis</i> BCG	4	4 <i>M. bovis</i> BCG	
<i>M. microti</i>	9	9 <i>M. microti</i>	
total	82	82	

In the second study, 77 clinical isolates grown in **liquid medium** were analyzed [7]. For all samples, the **GenoType MTBC** results were in agreement with the results of the biochemical or molecular differentiation (see table 2).

Table 2: Results of the *M. tuberculosis* complex differentiation [bacteria grown in liquid medium; DNA extraction with quick method]

result GenoType MTBC	number of isolates	result conventional methods	
<i>M. tuberculosis</i>	71	71 <i>M. tuberculosis</i>	diagnostic sensitivity: 100% diagnostic specificity: 100% positive predictive value: 100% negative predictive value: 100%
<i>M. africanum</i>	1	1 <i>M. africanum</i>	
<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>	5	5 <i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>	
total	77	77	

The Primer Nucleotide Mix (PNM) has been replaced by new kit constituents, namely **Amplification Mixes A** and **B** (AM-A and AM-B). In order to check if the change of kit constituents impacts test results, 72 liquid and solid cultures were tested with both kit variants. DNA was extracted using the quick method described in chapter DNA Extraction. In addition, 2 negative controls (water instead of DNA added to the aliquoted master mix) were tested. The results were identical for all samples (see table 3).

Table 3: Results of the *M. tuberculosis* complex differentiation [Primer Nucleotide Mix compared to Amplification Mixes; DNA extraction with quick method]

result GenoType MTBC with Primer Nucleotide Mix	number of isolates	result GenoType MTBC with Amplification Mixes
<i>M. tuberculosis</i>	60	60 <i>M. tuberculosis</i>
<i>M. africanum</i>	4	4 <i>M. africanum</i>
<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>	4	4 <i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>
<i>M. bovis</i> subsp. <i>caprae</i>	1	1 <i>M. bovis</i> subsp. <i>caprae</i>
<i>M. bovis</i> BCG	2	2 <i>M. bovis</i> BCG
high GC gram-positive bacterium	3	3 high GC gram-positive bacterium
negative	2	2 negative
total	74	74

DNA Extraction with **GenoLyse**®

In a study comprising 52 *Mycobacterium*-positive cultures (growth on Loewenstein-Jensen medium or in BACTEC MGIT 960 medium), DNA was extracted with the **GenoLyse**® kit and then tested with the **GenoType MTBC**. For comparison, DNA was isolated with the quick method in parallel and then tested with the **GenoType MTBC**.

With both extraction methods, identical results were obtained (see table 4).

Table 4: Results of the *M. tuberculosis* complex differentiation [DNA extraction with quick method compared to DNA extraction with **GenoLyse**®]

result after DNA extraction with quick method	number of isolates	result after DNA extraction with GenoLyse ®
<i>M. tuberculosis</i>	47	47 <i>M. tuberculosis</i>
<i>M. bovis</i> BCG	2	2 <i>M. bovis</i> BCG
high GC gram-positive bacterium	3	3 high GC gram-positive bacterium
total	52	52

The Primer Nucleotide Mix (PNM) has been replaced by new kit constituents, namely **Amplification Mixes A** and **B** (AM-A and AM-B). In order to check if the change of kit constituents impacts test results, 92 solid cultures were tested with both kit variants. DNA was extracted using the **GenoLyse**® kit. In addition, 2 negative controls (water instead of DNA added to the aliquoted master mix) were tested. The results were identical for all samples (see table 5).

Table 5: Results of the *M. tuberculosis* complex differentiation (Primer Nucleotide Mix compared to Amplification Mixes; DNA extraction with **GenoLyse**[®])

result GenoType MTBC with Primer Nucleotide Mix	number of isolates	result GenoType MTBC with Amplification Mixes
<i>M. tuberculosis</i>	48	48 <i>M. tuberculosis</i>
<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>	2	2 <i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>
<i>M. bovis</i> BCG	2	2 <i>M. bovis</i> BCG
high GC gram-positive bacterium	40	40 high GC gram-positive bacterium
negative	2	2 negative
total	94	94

Further performance studies of the **GenoType MTBC** were published [8,9,10].

Analytical performance

Analytical specificity

The specificity of the **GenoType MTBC** test is ensured by the accurate design of specific primers and probes which considers, among others, homology comparisons of the sequences published in gene databases, and by stringent reaction conditions.

The analytical specificity of the **GenoType MTBC** (with Primer Nucleotide Mix) was determined with 98 strains of 75 different species and subspecies. The study included the *Mycobacterium tuberculosis* complex strains *M. africanum*, *M. bovis* BCG (5x), *M. bovis* subsp. *bovis* (7x), *M. bovis* subsp. *caprae*, *M. microti*, and *M. tuberculosis* (2x) as well as the following strains not detectable with the test system: *Actinomyces naeslundii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacillus cereus*, *Bacteroides forsythus*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *C. bovis*, *C. durum*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Gordona rubropertinctus*, *Klebsiella oxytoca*, *M. abscessus*, *M. alvei* (2x), *M. asiaticum*, *M. avium*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. duvalii*, *M. feldmannii*, *M. fortuitum* (2 sequevars), *M. gastri*, *M. genavense*, *M. goodii*, *M. gordonae*, *M. haemophilum*, *M. heckeshornense*, *M. immunogenum* (2x), *M. interjectum* (2x), *M. intermedium* (2x), *M. intracellulare* (2x), *M. kansasii*, *M. lentiflavum*, *M. mageritense*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. mucogenicum*, *M. nonchromogenicum*, *M. palustre* (2x), *M. peregrinum*, *M. phlei*, *M. ratisbonense*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoidei*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. szulgai*, *M. terrae*, *M. triplex* (2x), *M. ulcerans*, *M. vaccae*, *M. xenopi*, MRSA, *Nocardia abscessus*, *N. africana*, *N. amarae*, *N. asteroides*, *N. farcinica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Rhodococcus equi* (3x), *R. erythropolis*, *Saccharomonospora glauca*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. intermedium*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Tsukamurella inchonensis*, *T. paurometabola* (3x).

The 17 *M. tuberculosis* complex strains were correctly identified. The further 81 isolates displayed no MTBC band and no species-specific banding pattern. Hence, the analytical specificity was 100%.

Reproducibility

Intra-assay precision

In order to determine the intra-assay precision of the **GenoType MTBC** (with Primer Nucleotide Mix), one *M. microti* strain, one *M. bovis* BCG strain, one *M. gordonae* strain, and one negative control were set up in five parallels and tested under identical conditions. DNA extraction was performed using the quick method described in chapter DNA Extraction. All strains showed the expected signals in all five parallels and the negative controls were negative. Hence, the intra-assay precision was 100%.

In order to determine the intra-assay precision of the **GenoType MTBC** (with Amplification Mixes), two *M. bovis* BCG strains, one *M. gordonae* strain, and one negative control were set up in four parallels and tested under identical conditions. DNA extraction was performed using the **GenoLyse**[®] kit. All strains showed the expected signals in all four parallels and the negative controls were negative. Hence, the intra-assay precision was 100%.

Inter-assay precision

In order to determine the inter-assay precision of the **GenoType MTBC** (with Primer Nucleotide Mix), one *M. microti* strain, one *M. bovis* BCG strain, one *M. gordonae* strain, and one negative control were set up in five parallels and tested at three different points in time. The other experimental conditions (instruments, lot numbers, operator, etc.) were identical. DNA extraction was performed using the quick method described in chapter DNA Extraction. All strains showed the expected signals in all five parallels and the negative controls were negative. Hence, the inter-assay precision was 100%.

In order to determine the inter-assay precision of the **GenoType MTBC** (with Amplification Mixes), two *M. bovis* BCG strains, one *M. gordonae* strain, and one negative control were tested at three different points in time. The other experimental conditions (instruments, lot numbers, operator, etc.) were identical. DNA extraction was performed using the **GenoLyse**[®] kit. All strains showed the expected signals and the negative controls were negative. Hence, the inter-assay precision was 100%.

Interfering substances

There are substances that may inhibit PCR reactions. Such inhibitors may, for example, originate from the culture medium. In order to assess if the medium influences the **GenoType MTBC**, 5 different *M. tuberculosis* samples and 5 different *M. bovis* subsp. *bovis* samples were cultured in 4 different media (solid media: Loewenstein-Jensen, Stonebrink, and Middlebrook-7H10, liquid medium: MGIT (Becton Dickinson)). Then the culture samples and 5 non-inoculated media samples were tested with the **GenoType MTBC** (with Primer Nucleotide Mix). All *M. tuberculosis* samples and all *M. bovis* subsp. *bovis* samples showed the correct results and the non-inoculated controls were negative. Hence, it can be excluded that the tested media import inhibitors into the **GenoType MTBC** test.

Other inhibitors may be imported by reagents used for DNA extraction. When using the recommended quick protocol (see chapter DNA Extraction), however, this is impossible because the method is based on mechanical cell lysis where no reagents are added.

Stability

Stability is determined according to DIN EN ISO 23640.

Shelf life of the **GenoType MTBC** test kit when stored as recommended: see box label.

References

1. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2011. WHO/HTM/TB/2011.16. World Health Organization, Geneva, Switzerland 2011.
2. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th edition. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 2009.
3. Protection of laboratory workers from instrument biohazards and infectious disease transmitted by blood, body fluids, and tissue. Approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards), USA, Document M29 (please refer to the latest version).
4. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 1985.
5. Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA 1992.
6. Richter E, Weizenegger M, Rüschi-Gerdes S, Niemann S. Evaluation of GenoType MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 2003; 41:2672-2675.
7. Richter E, Weizenegger M, Fahr AM, Rüschi-Gerdes S. Usefulness of the GenoType MTBC assay for differentiating species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in cultures obtained from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2004; 42:4303-4306.
8. Gomez MP, Herrera-León L, Jiménez MS, Rodríguez JG. Comparison of GenoType MTBC with RFLP-PCR and multiplex PCR to identify *Mycobacterium tuberculosis* complex species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26:63-66.
9. Neonakis IK, Gitti Z, Petinaki E, Maraki S, Spandidos DA. Evaluation of the GenoType MTBC assay for differentiating 120 clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26:151-152.
10. Somoskovi A, Dormandy J, Rivenburg J, Pedrosa M, McBride M, Salfinger M. Direct comparison of the GenoType MTBC and genomic deletion assays in terms of ability to distinguish between members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates and in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1854-1857.

Important Changes in IFU-301-09

Chapter	Change
	generally revised and restructured: <ul style="list-style-type: none">– former chapter "Methodology" extended and split in new chapters "Intended Use" and "Principles of the Procedure"– former chapter "Storage and Precautions" extended and split in new chapters "Storage and Disposal of Kit Constituents", "Precautions for Handling Kit Constituents", and "Specimen Requirements"– new chapters: "Summary and Explanation", "Ordering Information", "Performance Characteristics", "References", "Important Changes"
DNA Extraction several (especially Amplification)	DNA extraction can now be done using the GenoLyse® kit. In order to obtain a fully reactive master mix, now only two pipetting steps have to be performed combining the two Amplification Mixes A and B (AM-A and AM-B). They come as Kit Component 2 and must be stored at -20°C. AM-A already includes Taq polymerase and buffer; hence, the enzyme has not to be purchased and added separately any more.

HAIN

LIFESCIENCE

301-09-03

CE

IVD



Hain Lifescience GmbH

Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany
www.hain-lifescience.de, +49 (0) 74 73- 94 51- 0