

# BactoReal<sup>®</sup> Kit

## *Chlamydophila pneumoniae*

### Gebrauchsanleitung



For Research Use Only



DHUB00953



50 Reaktionen



**ingenetix GmbH**

Arsenalstraße 11

1030 Vienna, Austria

T +43(0)1 36 1980 198

F +43(0)1 36 1980 199

office@ingenetix.com

www.ingenetix.com

## Inhaltsverzeichnis

1. Verwendungszweck.....	3
2. Produktbeschreibung.....	3
3. Erregerinformation.....	3
4. Inhalt, Stabilität und Lagerung.....	4
5. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte.....	4
6. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise.....	4
7. Grenzen des Verfahrens.....	5
8. Vorbereitung der Proben.....	6
9. Vorbereitung der real-time PCR.....	6
9.1. Pipettierschema.....	6
9.2. Programmierung des Temperaturprofils.....	7
10. Interpretation der PCR-Daten.....	7
11. Troubleshooting.....	8
11.1. Kein Signal im FAM Kanal und Cy5 Kanal mit Kontrollen und Probe:.....	8
11.2. Valide Ergebnisse mit Kontrollen, kein Signal im FAM Kanal und Cy5 Kanal mit Probe:.....	8
11.3. Erreger-Signal in der Negativkontrolle:.....	8
11.4. Erreger-Signal in der Negativkontrolle der Extraktion:.....	8
12. Spezifikation und Evaluierung der Testperformance.....	9
12.1. Testperformance.....	9
12.2. Nachweisgrenze und Linearität.....	10
12.3. Analytische Spezifität.....	10
13. Literatur.....	10

## Erklärung der Symbole



Chargen-Bezeichnung



Bestell-Nummer



Ausreichend für "n" Ansätze



Ätzwirkung, GHS05



Verwendbar bis



Hergestellt von



Aufbewahrung bei



Ausrufezeichen, GHS07

## 1. Verwendungszweck

BactoReal® Kit *Chlamydomphila pneumoniae* ist ein Nachweistest für *Chlamydomphila pneumoniae* DNA mittels real-time Polymerase-Kettenreaktion.

## 2. Produktbeschreibung

BactoReal® Kit *Chlamydomphila pneumoniae* detektiert das ompA Gen von *C. pneumoniae*.

Mit diesem Test kann DNA von *C. pneumoniae*, die aus Proben des Respirationstraktes extrahiert wurde (z.B. mit dem QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen), detektiert werden.

Eine Sonden-spezifische Amplifikationskurve im Fluoreszenzkanal für FAM (530 nm) zeigt die Amplifikation der *Chlamydomphila pneumoniae* spezifischen DNA. Die interne DNA Positivkontrolle (DNA IPC) wird im Cy5 Kanal detektiert und dient als Kontrolle der DNA Extraktion und real-time PCR Inhibitionskontrolle. Das Target für die DNA IPC wird während der Probenextraktion zugegeben.

Dieser Test wurde mit dem Applied Biosystems® 7500 Fast Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific) validiert und zusätzlich mit dem LightCycler® 480 Instrument II (Roche) und Mx3005P® QPCR System (Agilent) getestet. Er eignet sich aber auch für andere real-time PCR Geräte, die Fluoreszenz im FAM und Cy5 Kanal messen und differenzieren können.

Dieser Test basiert auf der real-time Polymerase-Kettenreaktion. Dazu wird ein spezifischer DNA-Bereich aus dem Erregergenom amplifiziert und das generierte PCR-Produkt mit Hilfe einer fluoreszenz-markierten Oligonukleotid-Sonde detektiert. Dies ermöglicht den sequenzspezifischen Nachweis von PCR Amplifikaten.

Ingenetix ViroReal®, BactoReal® und ParoReal Kits ermöglichen den Nachweis von DNA und RNA in einem PCR Lauf.

## 3. Erregerinformation

*Chlamydomphila pneumoniae* (vormals *Chlamydia pneumoniae*) ist ein Gram-negatives obligat intrazelluläres Bakterium mit weltweiter Verbreitung. Ursprünglich galt *C. pneumoniae* als ausschließlich human pathogen, mittlerweile wurde dieser Erreger aber auch in Pferden, Koalas, Amphibien und Reptilien und anderen Tieren nachgewiesen. In Menschen verursacht *C. pneumoniae* Pharyngitis, Bronchitis und atypische Pneumonie (ambulant erworbene Pneumonie).

## 4. Inhalt, Stabilität und Lagerung

Beschriftung	Inhalt	Menge	Lagerung
Chlamydomphila pneumoniae Assay Mix (grüner Verschluss)	Primer und Sonde (FAM) für <i>C. pneumoniae</i> Detektion	1 x 50 µl	-15 °C bis -25 °C
DNA IPC-3 Assay Mix (gelber Verschluss)	Primer und Sonde (Cy5) für DNA IPC Detektion	1 x 50 µl	-15 °C bis -25 °C
DNA IPC Target (oranger Verschluss)	Target für DNA IPC (internes DNA Positivkontrollsystem)	1 x 100 µl	-15 °C bis -25 °C
Chlamydomphila pneumoniae Positive Control (roter Verschluss)	DNA Positivkontrolle (ca. 10.000 Targetkopien/µl)	1 x 25 µl	-15 °C bis -25 °C
DNA Reaction Mix (weißer Verschluss)	2 x DNA Reaktionsmix	1 x 500 µl	<b>-15 °C bis -25 °C, nach erstem Auftauen bei +4 °C</b>
Nuclease-free water (blauer Verschluss)	Nuclease-freies Wasser	1 x 1000 µl	-15 °C bis -25 °C

Die Komponenten des BactoReal® Kit *Chlamydomphila pneumoniae* sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum haltbar.

## 5. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Reagenzien und Laborgeräte für DNA-Extraktion
- Nuclease-freies Wasser für Verdünnung des DNA IPC Targets
- Puderfreie Laborhandschuhe (Einweghandschuhe)
- Pipetten (einstellbar)
- Pipettenspitzen mit Filter
- Vortex-Mixer
- Tischzentrifuge mit Rotor für 2 ml Reaktionsgefäße
- Real-time PCR Gerät, welches Fluoreszenz im FAM und Cy5 Kanal messen und differenzieren kann
- Optische 96 Well Reaktionsplatten oder Reaktionsgefäße

## 6. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise

- Labortische und Hilfsmittel müssen regelmäßig gereinigt werden.
- Die Verwendung von sterilen aerosol-resistenten Pipettenspitzen und puderfreien Einweghandschuhen ist erforderlich.
- Proben sollten als potenziell infektiös behandelt werden, gemäß den Vorschriften für sicheres Laborarbeiten. Tragen Sie Laborhandschuhe bei der Handhabung von klinischem Probenmaterial und Kitreagenzien.
- Separat getrennte Arbeitsbereiche sind für die Aufbereitung des Probenmaterials, Vorbereitung der real-time PCR und Amplifikation zu verwenden. Die Geräte und Materialien müssen diesen Arbeitsbereichen zugeordnet sein. Der Arbeitsablauf muss von Prä- zu Post-PCR im Labor verlaufen.
- Beim Hantieren mit den Proben und der Positivkontrolle ist Vorsicht geboten, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Nach der Verwendung der Proben und der Positivkontrolle sollten die Handschuhe gewechselt werden.
- Die Lagerung von positivem und potentiell positivem Material sollte separat von allen anderen Reagenzien erfolgen.
- Die Qualität der DNA hat großen Einfluss auf die Testperformance. Es muss sichergestellt sein, dass das verwendete DNA Extraktionssystem mit real-time PCR Technologie kompatibel ist.
- Kontaminationen von Geräten und Materialien mit DNA/RNA, Nukleasen oder Amplifikationsprodukten sind durch gute Laborpraxis zu vermeiden.
- Komponenten sollten vor Licht geschützt werden und wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden.
- In jedem PCR-Lauf muss eine Negativkontrolle (Nuclease-freies Wasser statt Probe) mitgeführt werden.

- Für eine zulässige Interpretation der Ergebnisse sollte eine Negativkontrolle während der DNA-Extraktion (z.B. Extraktion von Wasser anstelle von Probenmaterial) mit einbezogen werden, um falsch-positive Ergebnisse aufgrund von Kontamination mit Erreger DNA während der Extraktion ausschließen zu können.
- Probenmaterial, Reagenzien und Abfall sollten gemäß lokaler Sicherheitsbestimmungen, entsorgt werden
- Reagenzien aus verschiedenen Kits oder Chargen sollten nicht vermischt werden.
- Bitte beachten Sie das Ablaufdatum des Kits.
- **Vorsicht:** Das DNA IPC Target wird in Stabilizer aufbewahrt, welcher Guanidinthiocyanat/Triton X-100 enthält (siehe MSDS, [www.ingenetix.com](http://www.ingenetix.com)).

## 7. Grenzen des Verfahrens

- Zuverlässige Ergebnisse sind nur bei Anwendung sachgemäßer Verfahren für Entnahme, Transport, Lagerung und Aufarbeitung der Proben gewährleistet.
- Mit diesem Kit wurde die Gewinnung und Detektion von *C. pneumoniae* DNA aus respiratorischen Proben validiert.
- Ergebnisse können durch unsachgemäße Probenentnahme, technische Fehler, Probenverwechslung oder eine Erregerzahl unterhalb der Nachweisgrenze beeinträchtigt werden. PCR Inhibitoren können zu einem ungültigen Ergebnis führen.
- Obwohl dieser Test hochspezifische Primer und Sonden beinhaltet, können eventuell vorhandene Sequenzvariabilitäten in der Target-Region von bislang nicht bekannten klinischen Subtypen zu falsch-negativen oder weniger sensitiven Ergebnissen führen.

## 8. Vorbereitung der Proben

Extrahieren Sie die Probe mit einem DNA Extraktionssystem, das mit real-time PCR Technologie kompatibel ist. Es sollte immer eine Negativkontrolle der DNA-Extraktion mitgeführt werden (z.B. Extraktion von Wasser anstelle von Probenmaterial).

Das **DNA IPC Target** wird während der Extraktion zugesetzt. Die DNA IPC dient der Kontrolle der Extraktion, identifiziert mögliche PCR Inhibierungen und überprüft die Integrität der Kit Reagenzien. **Achtung:** Das unverdünnte DNA IPC Target darf nicht direkt zum Probenmaterial pipettiert werden, sondern muss zum Lysepuffer zugegeben werden.

→ Bei Elutionsvolumen von 50-100 µl: Pro Probe Zugabe von 1 µl DNA IPC Target zum Lysepuffer.

→ Bei Elutionsvolumen >100 µl oder bei Gebrauch eines automatischen Extraktionssystems: Pro Probe Zugabe von 2 µl DNA IPC Target zum Lysepuffer.

## 9. Vorbereitung der real-time PCR

- Pro PCR-Lauf sollten eine Positivkontrolle, eine Negativkontrolle der PCR (Wasser) und eine Negativkontrolle der DNA-Extraktion mitgeführt werden.
- Generell wird empfohlen, Proben in Duplikaten zu analysieren, um die Nachweiswahrscheinlichkeit zu erhöhen und die Interpretation der Ergebnisse zu erleichtern.
- DNA Proben auf Eis auftauen.
- Kitkomponenten müssen vor dem Ansetzen des Master Mixes vollständig bei Raumtemperatur auftauen. Nach dem Auftauen werden die einzelnen Komponenten gemischt, kurz zentrifugiert und anschließend auf Eis gestellt.
- Den DNA Reaktionsmix mischen, um eine homogene Lösung zu erhalten.
- **Positivkontrolle**  
→ Setzen Sie 1 µl *Chlamydomphila pneumoniae* Positivkontrolle + 4 µl Nuklease-freies Wasser ein. Positivkontrolle immer zuletzt pipettieren.

### 9.1. Pipettierschema

		<b>Pro Probe</b>
<b>Ansetzen Master Mix</b> (gut durchmischen)	Nuclease-free Water*	3,0 µl
	DNA Reaction Mix	10,0 µl
	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i> Assay Mix	1,0 µl
	DNA IPC-3 Assay Mix	1,0 µl
	<b>Gesamtvolumen Master Mix</b>	<b>15,0 µl</b>
<b>Ansetzen PCR-Reaktion</b>	Master Mix	15,0 µl
	DNA-Probe*	5,0 µl
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20,0 µl</b>

\*Von der Probe können 1-8 µl eingesetzt werden. Bei ≠ 5 µl Probe muss das H<sub>2</sub>O-Volumen angepasst werden.

→ **Falls das DNA IPC Target nicht während der Extraktion zugegeben wurde:** Verdünnen Sie das DNA IPC Target frisch 1:100 mit Nuklease-freiem Wasser und geben Sie 1 µl pro Probe direkt zum Master Mix zu. **Achtung:** Bei Verwendung von mehr als 1 µl 1:100 verdünntem DNA IPC Target pro Reaktion wird die real-time PCR Reaktion inhibiert.

## 9.2. Programmierung des Temperaturprofils

Informationen zur Programmierung der PCR-Geräte finden Sie im jeweiligen Benutzerhandbuch des Herstellers.

Bitte beachten Sie, dass manche PCR-Plattformen vor der Verwendung einer Multiplex-PCR mit den jeweiligen Farbstoffen kalibriert werden müssen.

**Auswahl der Detektionskanäle:** FAM-TAMRA, 530 nm (für *Chlamydomphila pneumoniae*)  
Cy5-NONE, 667 nm (für DNA IPC-3)

**Auswahl des Referenzfarbstoffes:** ROX

**Probenvolumen:** 20 µl

**Temperaturprofil:**

Program 1	Program 2	Program 3
Cycles: 1 Analysis: None	Cycles: 1 Analysis: None	Cycles: 45 Analysis: Quantification Acquisition at 60°C
50°C	95°C 20 sec	95°C 5 sec
*2 min		60°C 1 min

Für ABI PRISM® 7500:  
Ramp speed: "Standard"

Für LightCycler® 480 instrument:  
Detection format: 2 Color Hydrolysis Probe

**\*Anmerkung:** Falls im selben PCR-Lauf auch virale RNA nachgewiesen werden soll, muss im Programm 1 auf 15 min bei 50°C verlängert werden. Dieses Temperaturprofil kann für alle ingenetix ViroReal®, BactoReal®, MycoReal und ParoReal Kits zum Nachweis von DNA oder RNA verwendet werden.

## 10. Interpretation der PCR-Daten

Für die Analyse der PCR-Ergebnisse wählen Sie die Fluoreszenzdarstellungs-Optionen 530 nm (FAM Kanal) für das *Chlamydomphila pneumoniae* Target und 667 nm (Cy5 Kanal) für das DNA IPC Target. Proben mit positiven Ct oder Cp-Werten werden positiv gewertet. Bitte überprüfen Sie die Amplifikationskurven auch manuell. Proben sollten sowohl in der logarithmischen als auch linearen Ansicht interpretiert und mit der Negativkontrolle verglichen werden.

	FAM Kanal <i>C. pneumoniae</i> Target	Cy5 Kanal DNA IPC Target	Bewertung
Negativkontrolle	Negativ	Negativ / Positiv <sup>1</sup>	Valid
Positivkontrolle	Positiv	Negativ / Positiv <sup>1</sup>	Valid
Negative Extraktionskontrolle	Negativ	Positiv	Valid
Probe	Positiv	Positiv / Negativ <sup>2</sup>	Positiv
Probe	Negativ	Positiv	Negativ <sup>3</sup>
Probe	Negativ	Negativ	Invalid

<sup>1</sup>Nur positiv wenn das 1:100 frisch verdünnte DNA IPC Target direkt zum Master Mix zugegeben wurde

<sup>2</sup>Eine hohe Erregerkonzentration in der Probe kann zu einem reduzierten oder negativen Signal der DNA IPC führen

<sup>3</sup>Das positive Signal der DNA IPC schließt eine mögliche PCR-Inhibition aus. Die IPC Ct-Werte sollten jedoch vergleichbare Ergebnisse zeigen. Eine Verschiebung der Ct-Werte kann auf eine partielle Inhibition hindeuten.

Im Fall von invaliden Daten muss die Analyse mit der restlichen oder einer frisch extrahierten DNA-Probe wiederholt werden (siehe 11. Troubleshooting).

## 11. Troubleshooting

### 11.1. Kein Signal im FAM Kanal und Cy5 Kanal mit Kontrollen und Probe:

- Fehlerhafte Programmierung des Temperaturprofils oder fehlerhafte Einstellung der Detektionskanäle am real-time PCR Instrument.
  - Vergleichen Sie das Temperaturprofil und die Einstellung der Detektionskanäle mit den Angaben im Protokoll.
- Fehler in der Zusammensetzung der PCR-Reaktion.
  - Überprüfen Sie die Pipettierschritte an Hand des Schemas und wiederholen Sie die PCR falls nötig.

### 11.2. Valide Ergebnisse mit Kontrollen, kein Signal im FAM Kanal und Cy5 Kanal mit Probe:

- Falsche Einstellung der Detektionskanäle mit der Probe
  - Überprüfen Sie die richtige Einstellung der Detektoren.
- Falls das DNA IPC Target während der Extraktion zugegeben wurde:
  - PCR Inhibierung liegt vor.
  - DNA Extraktion ist fehlgeschlagen.
  - Das DNA IPC Target wurde nicht zum Lysepuffer der Probe pipettiert.
  - Die extrahierte Probe wurde nicht zur PCR-Reaktion zugegeben.
  - Eine Aussage ist nicht möglich. Überprüfen Sie, ob eine geeignete DNA-Extraktionsmethode verwendet wurde und überprüfen Sie die Arbeitsschritte der DNA-Extraktion.

### 11.3. Erreger-Signal in der Negativkontrolle:

- Es liegt eine Kontamination während der Vorbereitung der PCR vor.
  - Wiederholen Sie die PCR mit noch unbenutzten Reagenzien in Replikaten.
  - Pipettieren Sie die Positivkontrolle zuletzt.
  - Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig gereinigt werden.

### 11.4. Erreger-Signal in der Negativkontrolle der Extraktion:

- Es liegt eine aufreinigungsbedingte Kontamination vor.
  - Wiederholen Sie die DNA-Extraktion und PCR unter Verwendung noch unbenutzter Reagenzien.
  - Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig gereinigt werden.

## 12. Spezifikation und Evaluierung der Testperformance

### 12.1. Testperformance

Abbildung 1 zeigt die Performance von BactoReal® Kit *Chlamydomophila pneumoniae* mit dem Applied Biosystems® 7500 Fast Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific).

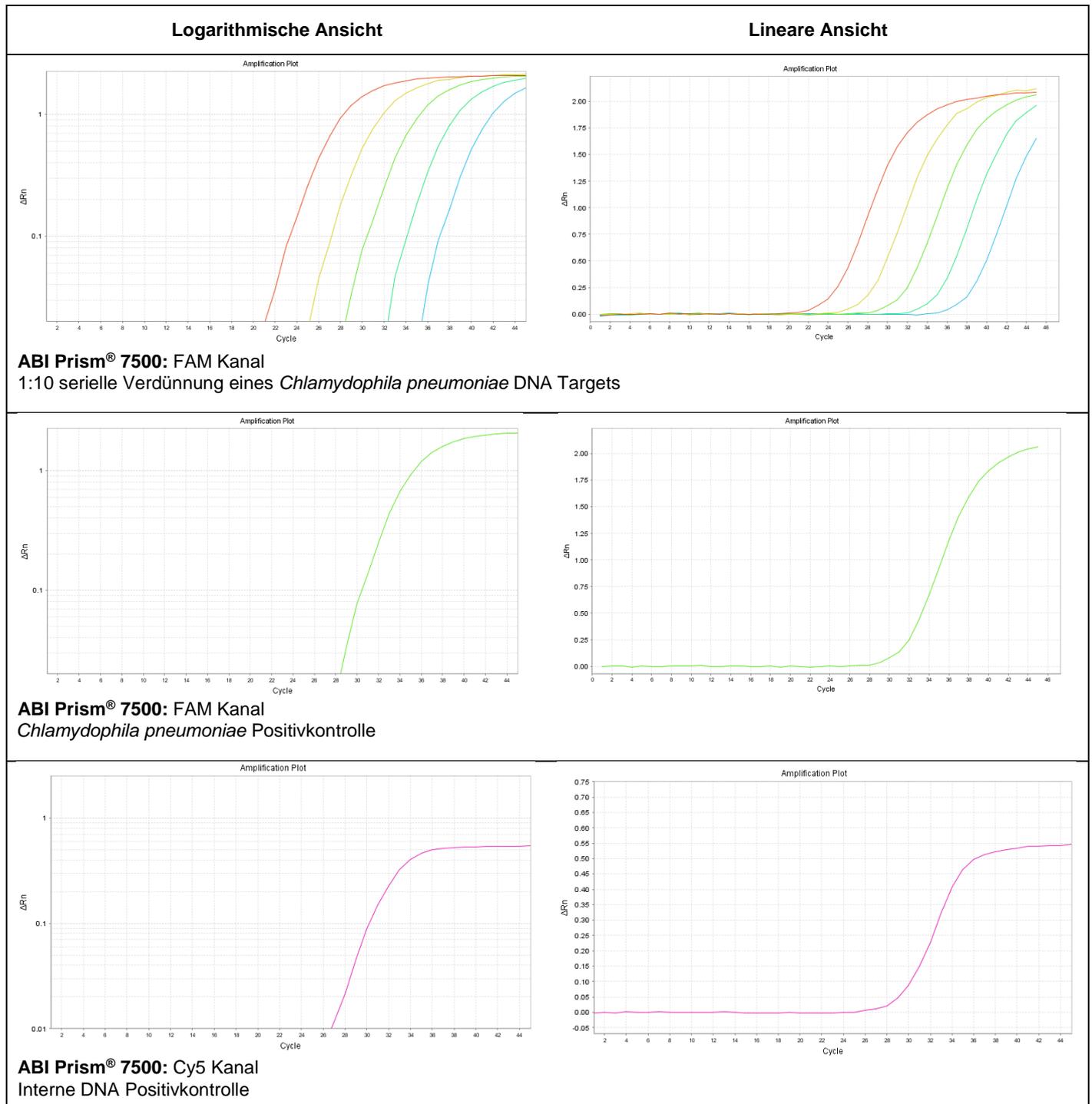


Abbildung 1 Performance des BactoReal® Kit *Chlamydomophila pneumoniae*

## 12.2. Nachweisgrenze und Linearität

BactoReal® Kit *Chlamydomphila pneumoniae* wurde mit einer 10-fach Verdünnungsserie eines Plasmids, welches Teile der *Chlamydomphila pneumoniae* DNA repräsentiert, getestet. Es konnten mindestens 10 Target Kopien/Reaktion nachgewiesen werden.

Die **Nachweisgrenze** (LoD95: Anzahl an Kopien, welche in 95% der Fälle positiv detektiert werden) beträgt 42 Kopien/Reaktion.

Die **Linearität** wurde mit einer 10-fachen Verdünnungsserie des Plasmids ermittelt. Der Test zeigt zwischen 100 - 1.000.000 Target Kopien/Reaktion eine Linearität mit einer Steigung von  $3,59 \pm 0,07$  und einem Korrelationskoeffizienten  $R_2$  von  $> 0,99$  (Abbildung 2).

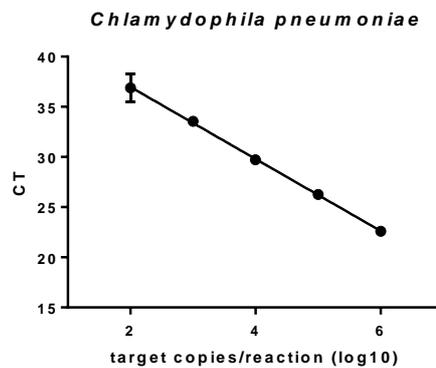


Abbildung 2 10-fache Verdünnungsreihe eines *C. pneumoniae* DNA Standards

## 12.3. Analytische Spezifität

Analytische Spezifität wird durch die Selektion hochspezifischer Primer und Sonden gewährleistet. Primer und Sonden wurden auf potentielle Homologien zu derzeit publizierten Sequenzen untersucht. Diese Datenbankanalyse validierte den Nachweis derzeit bekannter *C. pneumoniae* Stämme.

Die analytische Spezifität wurde mit genomischer DNA von Viren (Adenovirus 3) und von Bakterien (*Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*) getestet. Es wurden keine Kreuzreaktionen beobachtet.

Weiters wurden für die Evaluierung 80 DNA Isolate aus klinischem Probenmaterial untersucht. Dabei waren 37 Proben, welche mit einer akkreditierten Referenzmethode gemessen wurden, ebenfalls positiv mit BactoReal® Kit *Chlamydomphila pneumoniae*. Zusätzlich waren 43 DNA Proben, welche negativ mit der Referenzmethode getestet wurden, ebenfalls negativ mit BactoReal® Kit *Chlamydomphila pneumoniae*.

## 13. Literatur

Blasi F, Tarsia P, Aliberti S. 2009. *Chlamydomphila pneumoniae*. Clin. Microbiol. Infect. 15:29-35.