

BactoReal[®] Kit *Haemophilus influenzae*

Gebrauchsanleitung



CE

IVD

In vitro-Diagnostikum

REF

DHUB01053

Σ

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
12.4. Diagnostische Evaluierung.....	10
13. Literatur.....	10

Erklärung der Symbole



Chargen-Bezeichnung



Bestell-Nummer



Ausreichend für "n" Ansätze



Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98/79 EG für *in-vitro* Diagnostika



Ätzwirkung, GHS05



Verwendbar bis



Hergestellt von



Aufbewahrung bei



In vitro Diagnostikum



Ausrufezeichen, GHS07

1. Verwendungszweck

BactoReal® Kit *Haemophilus influenzae* ist ein *in vitro* Nachweistest für DNA von bekapselten und unbekapselten *H. influenzae* Stämmen mittels real-time Polymerase-Kettenreaktion.

2. Produktbeschreibung

BactoReal® Kit *Haemophilus influenzae* detektiert das outer membrane protein P6 (Omp P6) Gen von *Haemophilus influenzae*. Mit diesem Test werden sowohl bekapselte *H. influenzae* Stämme als auch unbekapselte *H. influenzae* Stämme (bezeichnet auch als nicht typisierbare *H. influenzae* Stämme, NTHi) nachgewiesen.

Mit diesem Test kann DNA von *H. influenzae*, die aus Proben des Respirationstraktes und aus Liquor extrahiert wurde (z.B. mit dem QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen), detektiert werden. Mit diesem Test können auch manche Stämme von *Haemophilus haemolyticus* und *Haemophilus parainfluenzae*, allerdings mit geringerer Sensitivität, nachgewiesen werden.

Eine Sonden-spezifische Amplifikationskurve im Fluoreszenzkanal für FAM (530 nm) zeigt die Amplifikation der *Haemophilus influenzae* 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

Die 16 Spezies der Gattung *Haemophilus* sind Gram-negative Bakterien, die mitunter die Schleimhäute von Menschen und Tieren besiedeln und Erkrankungen auslösen können. *Haemophilus aegyptius* zum Beispiel ist der Erreger einer purulenten Konjunktivitis, *Haemophilus parainfluenzae* ist ein seltener Erreger einer Form der Endokarditis. Eine Rolle als Krankheitserreger für *Haemophilus haemolyticus* ist nicht bekannt.

Haemophilus influenzae lebt ausschließlich in den Schleimhäuten des Menschen, vor allem in denen des oberen Atmungstrakts. Die Übertragung erfolgt über Tröpfcheninfektion. Der wichtigste Pathogenitätsfaktor von *H. influenzae* ist eine Polysaccharidkapsel. Je nach Kapseltyp werden die sechs Serotypen a-f unterschieden, wobei Kapseltyp b (*Haemophilus influenzae* Typ b, Hib) der häufigste ist, als besonders virulent gilt und der Erreger von Epiglottitis und schweren invasiven Infektionen wie auch Meningitis bei Kindern unter 5 Jahren ist. Nichtbekapselte *H. influenzae* Stämme (bezeichnet auch als nicht typisierbare *H. influenzae* Stämme, NTHi) stellen einen Teil der Normalflora des Menschen dar und sind nur unter bestimmten Umständen pathogen. Diese Stämme verursachen Otitis, Sinusitis, chronische Bronchitis, Pneumonie und weniger häufig Meningitis und Bakteriämie.

Das Omp P6 Gens von *H. influenzae* kommt sowohl in den bekapselten als auch in den unbekapselten *H. influenzae* Stämmen vor.

4. Inhalt, Stabilität und Lagerung

Beschriftung	Inhalt	Menge	Lagerung
Haemophilus influenzae Assay Mix (grüner Verschluss)	Primer und Sonde (FAM) für <i>H. influenzae</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
Haemophilus influenzae 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	-15 °C bis -25 °C, nach erstem Auftauen bei +4°C
Nuclease-free water (blauer Verschluss)	Nuklease-freies Wasser	1 x 1000 µl	-15 °C bis -25 °C

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

5. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Reagenzien und Laborgeräte für DNA-Extraktion
- Nuklease-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

- *In vitro*-Diagnostikum: Dieses Produkt sollte nur von Fachpersonal verwendet werden, das auf real-time PCR und *in vitro* Diagnose Verfahren geschult wurde.
- 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 (Nuklease-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).

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 Detektion von *Haemophilus influenzae* DNA aus Liquor sowie die Gewinnung und Detektion aus Sputum validiert. Die Testperformance mit anderen klinischen Probentypen wurde bislang noch nicht bewertet.
- Ein negatives Testergebnis schließt die Möglichkeit einer *Haemophilus influenzae* Infektion nicht aus, da die Ergebnisse durch unsachgemäße Probenentnahme, technische Fehler, Probenverwechslung oder eine Erregerzahl unterhalb der Nachweisgrenze beeinträchtigt werden können. 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.
- Ergebnisse sollten mit anderen Labordaten und klinischen Parametern im Kontext interpretiert werden, da *H. influenzae* auch in geringen Konzentrationen die Schleimhaut von gesunden Menschen besiedeln kann.

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 Haemophilus influenzae Positivkontrolle + 4 µl Nuklease-freies Wasser ein. Positivkontrolle immer zuletzt pipettieren.

9.1. Pipettierschema

		Pro Probe
Ansetzen Master Mix (gut durchmischen)	Nuclease-free Water*	3,0 µl
	DNA Reaction Mix	10,0 µl
	Haemophilus influenzae Assay Mix	1,0 µl
	DNA IPC-3 Assay Mix	1,0 µl
	Gesamtvolumen Master Mix	15,0 µl
Ansetzen PCR-Reaktion	Master Mix	15,0 µl
	DNA-Probe*	5,0 µl
	Gesamtvolumen	20,0 µl

*Von der Probe können 1-8 µl eingesetzt werden. Bei ≠ 5 µl Probe muss das H₂O-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 *Haemophilus influenzae*)
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 *Haemophilus influenzae* 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>Haemophilus influenzae</i> Target	Cy5 Kanal DNA IPC Target	Bewertung
Negativkontrolle	Negativ	Negativ / Positiv ¹	Valid
Positivkontrolle	Positiv	Negativ / Positiv ¹	Valid
Negative Extraktionskontrolle	Negativ	Positiv	Valid
Probe	Positiv	Positiv / Negativ ²	Positiv
Probe	Negativ	Positiv	Negativ ³
Probe	Negativ	Negativ	Invalid

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

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

³Das 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 *Haemophilus influenzae* mit dem Applied Biosystems® 7500 Fast Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific).

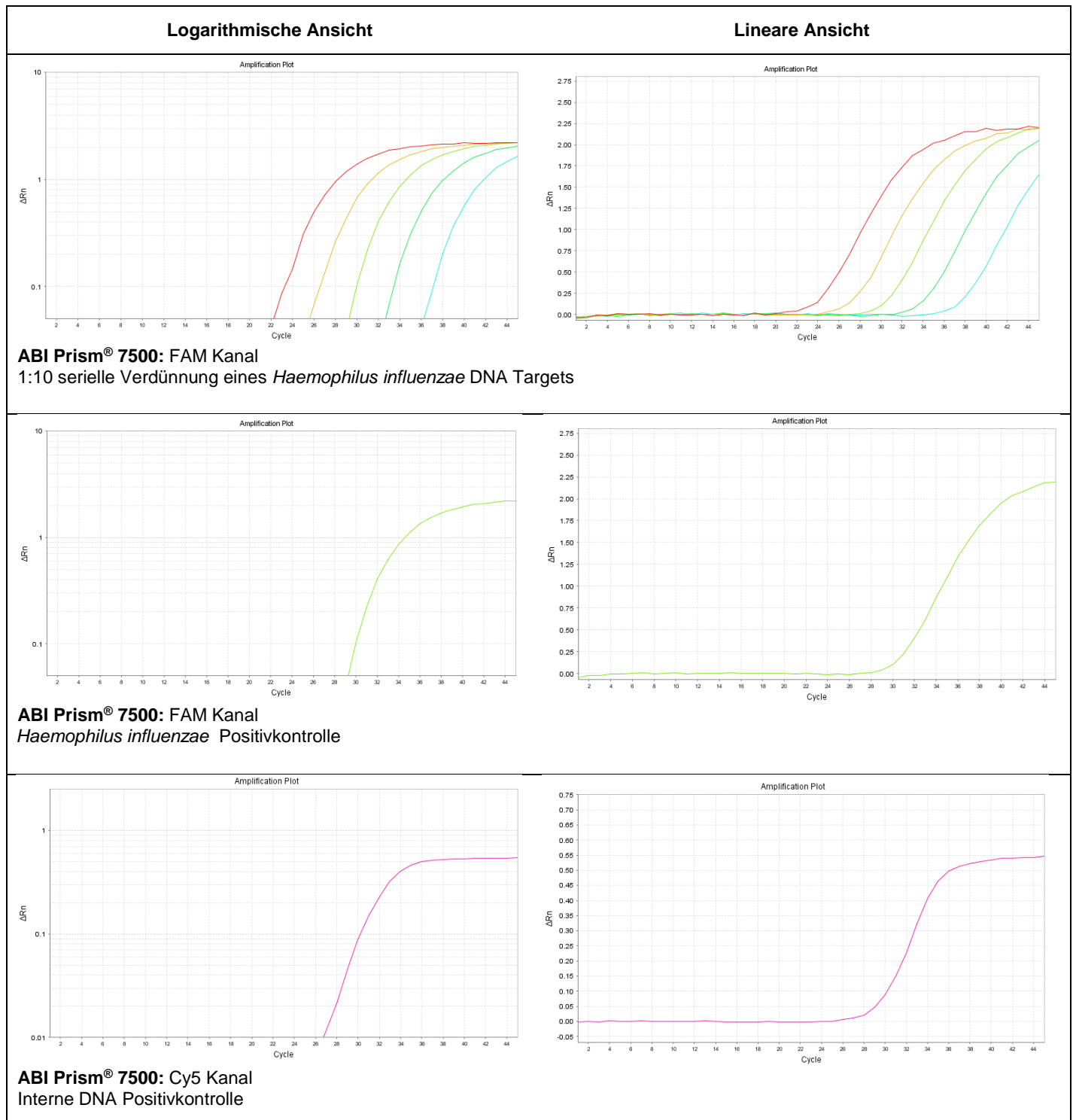


Abbildung 1 Performance des BactoReal® Kit *Haemophilus influenzae*

12.2. Nachweisgrenze und Linearität

BactoReal® Kit *Haemophilus influenzae* wurde mit einer 10-fach Verdünnungsserie eines Plasmids, welches Teile der *H. influenzae* 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 36 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 $-3,34 \pm 0,02$ und einem Korrelationskoeffizienten R_2 von $> 0,99$ (Abbildung 2).

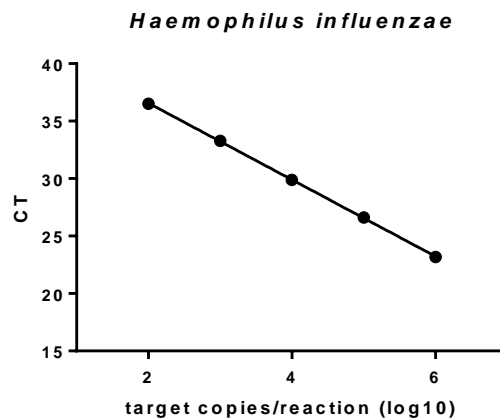


Abbildung 2 10-fache Verdünnungsreihe eines *Haemophilus influenzae* DNA Standards

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 *Haemophilus influenzae* Stämme. Die Sequenzvergleichs-Analyse zeigte eine mögliche Kreuzreaktion mit *H. parainfluenzae* und *H. haemolyticus*, allerdings mit geringerer Sensitivität.

Es wurden 50 Isolate von *Haemophilus influenzae* und ein Isolat von *Haemophilus influenzae* b positiv mit BactoReal® Kit *Haemophilus influenzae* getestet, während 2 Stämme *Haemophilus aphrophilus* und *Haemophilus parainfluenzae* negativ waren. Es wurden keine Kreuzreaktionen mit genomischer DNA von Adenovirus und von Isolaten anderer klinisch relevanter Bakterien (*Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*) beobachtet.

12.4. Diagnostische Evaluierung

Für die diagnostische Evaluierung wurden 38 Sputum Proben analysiert. Mittels konventioneller PCR und anschließender Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass die meist schwach-positiven Proben (CT > 30) *Haemophilus haemolyticus* und *Haemophilus parainfluenzae* entsprachen während die größtenteils stark positiven Proben (CT < 30) als *Haemophilus influenzae* bestätigt wurden.

13. Literatur

Kunze W, Müller L, Kilian M, Schuhmann MU, Baumann L, Handrick W. 2008. Recurrent posttraumatic meningitis due to nontypable *Haemophilus influenzae*: case report and review of the literature. *Infection*. 36:74-77.