

BactoReal[®] Kit *Streptococcus pneumoniae*

Gebrauchsanleitung

**CE****IVD***In vitro*-Diagnostikum**REF**

DHUB01453

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 *Streptococcus pneumoniae* ist ein *in vitro* Nachweistest für *Streptococcus pneumoniae* DNA mittels real-time Polymerase-Kettenreaktion.

2. Produktbeschreibung

BactoReal® Kit *Streptococcus pneumoniae* detektiert das *lytA* Gen von *S. pneumoniae*.

Mit diesem Test kann DNA von *S. pneumoniae*, die aus Liquor und 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 *Streptococcus 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

Streptococcus pneumoniae (Pneumokokken) ist ein Gram-positives, alpha-hämolytisches Bakterium, welches ambulant erworbene Pneumonie, Bronchitis, Mittelohrentzündungen, Meningitis und Sepsis verursachen kann. Pneumokokken besiedeln die Schleimhäute des oberen Respirationstraktes. Die Trägerrate bei gesunden Erwachsenen variiert zwischen 40% und 70%. Die Übertragung erfolgt über Tröpfcheninfektion. Die Erreger führen erst dann zu einer Infektion, wenn eine Schwäche des Immunsystems vorliegt.

4. Inhalt, Stabilität und Lagerung

Beschriftung	Inhalt	Menge	Lagerung
Streptococcus pneumoniae Assay Mix (grüner Verschluss)	Primer und Sonde (FAM) für <i>S. 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
Streptococcus 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	-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 *Streptococcus pneumoniae* 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 *S. pneumoniae* DNA aus Liquor sowie die Gewinnung und Detektion aus Sputum validiert. Die Testperformance mit anderen klinischen Probenotypen wurde bislang noch nicht bewertet.
- Ein negatives Testergebnis schließt die Möglichkeit einer *S. pneumoniae* Infektion nicht aus, da die Ergebnisse durch unsachgemäße Probenentnahme, technische Fehler, Probenverwechslung oder eine Erregerzahl unterhalb der Nachweiskennlinie 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 *S. pneumoniae* auch 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 Streptococcus pneumoniae 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
	Streptococcus pneumoniae 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 *Streptococcus 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 60°C 1 min
*2 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 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 *Streptococcus 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>S. pneumoniae</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 *Streptococcus pneumoniae* mit dem Applied Biosystems® 7500 Fast Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific).

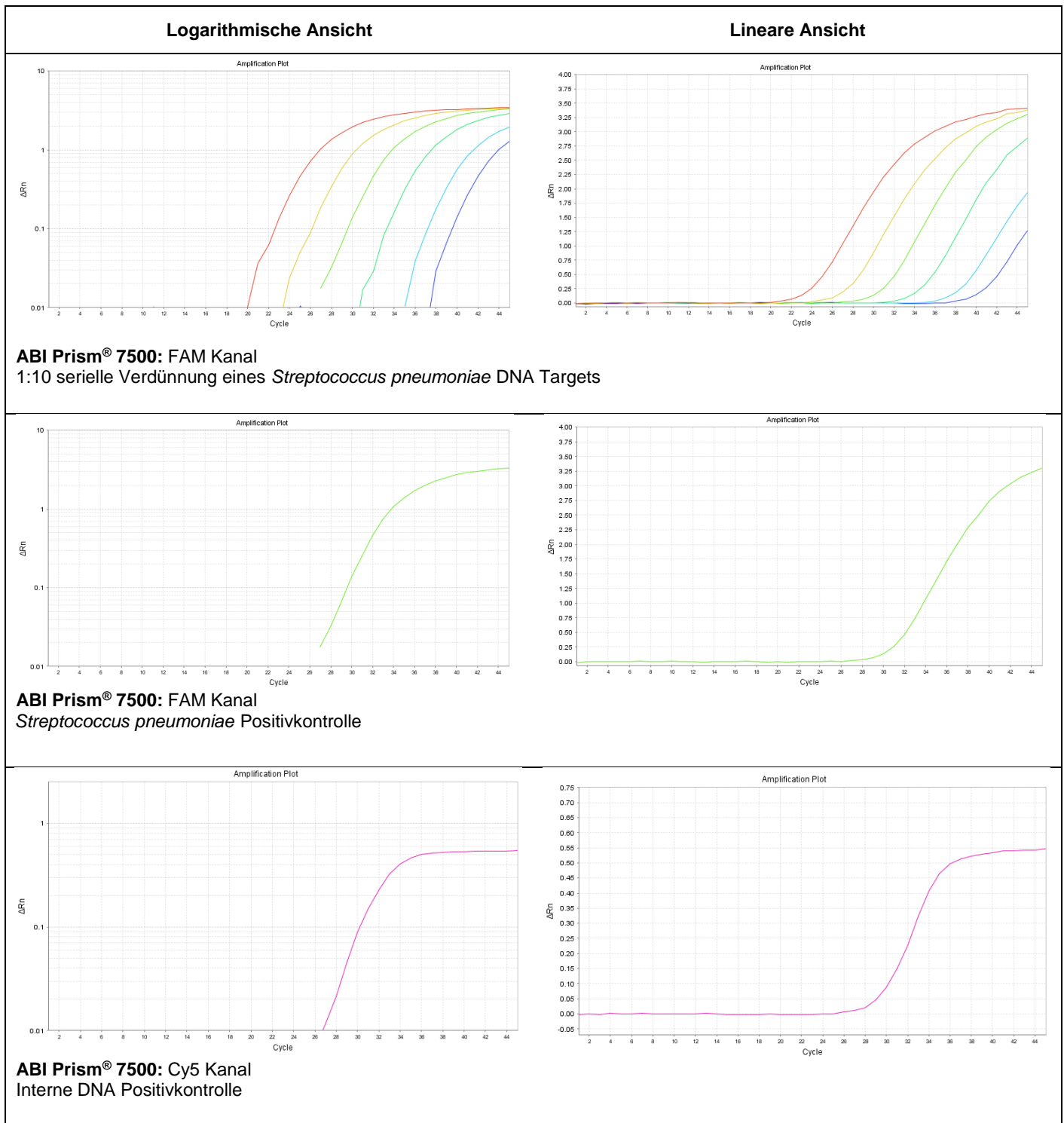


Abbildung 1 Performance des BactoReal® Kit *Streptococcus pneumoniae*

12.2. Nachweisgrenze und Linearität

BactoReal® Kit *Streptococcus pneumoniae* wurde mit einer 10-fach Verdünnungsserie eines Plasmids, welches Teile der *Streptococcus 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 27 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 $-3,49 \pm 0,05$ und einem Korrelationskoeffizienten R_2 von $> 0,99$ (Abbildung 2).

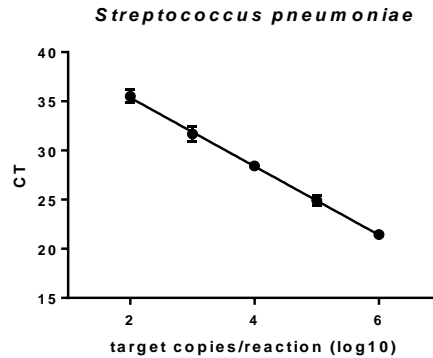


Abbildung 2 10-fache Verdünnungsreihe eines *S. pneumoniae* DNA Standards

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 *S. pneumoniae* Stämme.

Die analytische Spezifität wurde mit 15 *Streptococcus pneumoniae* Isolaten bestätigt. Genomische DNA von Adenovirus und von Isolaten anderer klinisch relevanter Bakterien (*Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*) war negativ mit BactoReal® Kit *Streptococcus pneumoniae*. Weiters wurden keine Kreuzreaktionen mit Isolaten von *S. agalactiae*, *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. equinus*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. parasanguinis*, *S. pyogenes*, *S. sanguis*, *S. uberis* und 16 β -hämolytischen Streptokokken Stämmen beobachtet.

12.4. Diagnostische Evaluierung

Für die diagnostische Evaluierung wurden 47 Sputum Proben untersucht. Dabei wurden 17 von 47 Proben positiv mit BactoReal® Kit *Streptococcus pneumoniae* getestet. Proben, welche positiv mit BactoReal® Kit *Streptococcus pneumoniae* getestet wurden, waren ebenfalls positiv mit einer real-time PCR Referenzmethode. Proben, welche mit der Referenzmethode negativ waren, waren ebenfalls negativ mit BactoReal® Kit *Streptococcus pneumoniae*. Vier mit BactoReal® Kit *Streptococcus pneumoniae* schwach positive Proben waren negativ mit der Referenzmethode.

13. Literatur

Obregón V, García P, García E, Fenoll A, López R, García JL. 2002. Molecular peculiarities of the lytA gene isolated from clinical pneumococcal strains that are bile insoluble. J Clin Microbiol. 40:2545-2554.