

BactoReal[®] Kit *H. pylori* ClariRes

Gebrauchsanweisung



CE

IVD

In vitro-Diagnostikum

REF

DHUB1000

Σ

50 Reaktionen



ingenetix GmbH
Haidingergasse 1
1030 Vienna, Austria
T +43(0)1 36 1980 1
F +43(0)1 36 1980 199
office@ingenetix.com
www.ingenetix.com

Inhaltsverzeichnis

1. Zweckbestimmung	3
2. Produktbeschreibung	3
3. Erregerinformation	3
4. Grundprinzip der real-time PCR	4
5. Inhalt, Stabilität und Lagerung	4
6. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte	5
7. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise	5
7.1 Generelle Hinweise	5
7.2 Spezifische Hinweise	5
8. Grenzen des Verfahrens	6
9. Vorbereitung der Proben	7
10. Vorbereitung der real-time PCR	8
10.1. Pipettierschema	8
10.2. Programmierung des Temperaturprofils	9
11. Interpretation der PCR-Daten	11
12. Troubleshooting	13
12.1. Kein <i>H. pylori</i> spezifisches Signal bei Positiv Kontrolle	13
12.2. Kein Signal der IC und kein <i>H. pylori</i> spezifisches Signal in Patientenprobe	13
12.3. Breite Schmelzkurve kann auf das Vorhandensein einer Mischinfektion deuten (Abb. 1 G, H)	13
12.4. Signal mit Tm zwischen 57 und 65°C bei Negativ Kontrolle der DNA-Extraktion	13
12.5. Signal mit Tm zwischen 57 und 65°C bei Negativ Kontrolle	13
13. Spezifikationen	14
13.1. Nachweisgrenze, LoD95%	14
13.2. Analytische Spezifität	14
13.3. Präzision	14
13.4. Diagnostische Evaluierung	14
14. Änderungsindex	16

Erklärung der Symbole

	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Katalognummer		Hersteller
	Ausreichend für "n" Prüfungen		Temperaturgrenzwerte (Aufbewahrung bei)
	Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98/79 EG für <i>in-vitro</i> Diagnostika		<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten		Eindeutige Produktidentifizierung
	Vor Sonnenlicht schützen		Inhalt
	Ätzwirkung, GHS05		Ausrufezeichen, GHS07

1. Zweckbestimmung

BactoReal® Kit *H. pylori* ClariRes ist ein nicht automatischer IVD Test zum qualitativen Nachweis der DNA (23S rRNA Gen) von *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) in Kombination mit der Detektion einer möglichen Clarithromycin Resistenz mittels real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Der Test ermöglicht den Nachweis einer *H. pylori* Infektion mit dem gleichzeitigen Nachweis des Wildtyps (empfindlich auf Behandlung mit Clarithromycin) sowie der drei häufigsten Punktmutationen (A2142C, A2142G, und A2143G) im 23S rRNA Gen von *H. pylori*, die für eine Resistenz gegen das Antibiotikum Clarithromycin verantwortlich sind.

Geeignete Untersuchungsmaterialien sind DNA-Extrakte aus Biopsie-Proben der Magenschleimhaut sowie frische oder gefrorene Stuhlproben ohne kulturelle Voranreicherung von *H. pylori*.

Dieser Test ist für Patienten aller Altersgruppen mit Verdacht auf eine Infektion mit *H. pylori* geeignet und dient in Kombination mit der Krankengeschichte und zusätzlichen klinischen Informationen zur Unterstützung der Diagnose einer *H. pylori* Infektion.

Der Test ist für den professionellen Gebrauch und darf nur von Fachpersonal verwendet werden, das auf real-time PCR und *in vitro* Diagnose Verfahren geschult wurde.

2. Produktbeschreibung

BactoReal® Kit *H. pylori* ClariRes ist ein real-time PCR Test und detektiert das 23S rRNA Gen von *H. pylori*.

Mit diesem Test wird eine Region im 23S rRNA Gen von *H. pylori*, welche die drei häufigsten Punktmutationen (A2142C, A2142G, und A2143G), die für die Clarithromycin-Resistenz in *H. pylori* verantwortlich sind, mittels real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Stämme, welche die Wildtyp-Sequenz des 23S rRNA Gens von *H. pylori* enthalten, sind empfindlich auf Behandlung mit Clarithromycin. Die Wildtyp-Sequenz und die Mutanten werden durch eine an die Amplifikation anschließende Schmelzkurven-Analyse im FAM/SYBR® Green Kanal detektiert und unterschieden (siehe 11. Auswertung PCR-Daten).

Die interne DNA-Positivkontrolle (IC) wird ebenfalls im FAM/SYBR® Green Kanal mittels einer Schmelzkurve detektiert und dient als Kontrolle der DNA-Extraktion und/oder als real-time PCR Inhibitionskontrolle. Das Target für die IC (artifizielle Target DNA) wird während der Probenextraktion zugegeben oder der PCR Reaktion zugesetzt.

BactoReal® Kit *H. pylori* ClariRes ist mit den real-time PCR Geräten LightCycler® 1.1/1.2/1.5 oder 2.0 Instrument (Roche), LightCycler® 480 (Roche), Geräten der Serie Quantstudio™ (Thermo Fisher Scientific), ABI® 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) und Magnetic Induction Cycler (MIC; Bio Molecular Systems) kompatibel. Bei Verwendung anderer PCR Geräte, welche eine Fluoreszenz im FAM/SYBR® Green Kanal messen und eine Schmelzkurve aufzeichnen können, muss der Test vor Verwendung validiert werden.

3. Erregerinformation

Helicobacter pylori kolonisiert den menschlichen Magen und ist mit zahlreichen Krankheiten des Verdauungstraktes wie Gastritis oder Zwölffingerdarm-Geschwüren assoziiert. Für den Nachweis von *H. pylori* sind einige diagnostische Tests verfügbar. Invasive Tests, die eine vorangegangene Gastroskopie voraussetzen, sind der Urease-Schnelltest, Kultur, Histologie und molekulare Methoden. Nicht-invasive Methoden inkludieren den Stuhl-Antigen Test, Serologie, C13-Atemtest und molekulare Methoden. Infektionen durch *H. pylori* können sehr effektiv mit Kombinationen von Protonen-Pumpen-Inhibitoren und verschiedenen Antibiotika behandelt werden. Die verstärkte Verwendung von Clarithromycin, das am häufigsten verwendete Antibiotikum, resultierte in der Entwicklung von Resistenzen. Drei wichtige Punktmutationen an zwei Positionen (A2142C, A2142G, und A2143G) innerhalb der Peptidyltransferase-Region der 23S rRNA sind am häufigsten mit der Clarithromycin-Resistenz von *H. pylori* Isolaten assoziiert.

Literatur:

Claudia Schabereiter-Gurtner, Alexander M. Hirschl, Brigitte Dragosics, Peter Hufnagl, Sonja Puz, Zsuzsanna Kovách, Manfred Rotter and Athanasios Makristathis. 2004. Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing in stool and biopsy specimens. J. Clin. Microbiol. 42:4512-8.

4. Grundprinzip der real-time PCR

Bei der Detektion mittels real-time PCR werden spezifische Bereiche aus dem Erregergenom amplifiziert. Die Detektion des PCR-Produkts findet mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen statt, die an Oligonukleotid-Sonden gekoppelt sind.

Nach Beendigung der eigentlichen PCR Amplifikation wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Bei einer Wildtyp-Targetsequenz dissoziiert die Oligonukleotid-Sonde bei ihrer Schmelztemperatur. Liegt eine Mutation in der Targetsequenz vor, dissoziiert die Oligonukleotid-Sonde bereits bei einer geringeren Temperatur. Diese Technologie ermöglicht eine sequenzspezifische Detektion des 23S rRNA Gens von *H. pylori* und die Bestimmung von drei Punktmutationen im PCR-Amplifikat.

5. Inhalt, Stabilität und Lagerung

Beschriftung	Inhalt	Menge	Lagerung
<i>H. pylori</i> Assay Mix (grüner Verschluss)	Primer + Sonde für Detektion von - <i>H. pylori</i> - IC (Interne Positiv Kontrolle)	1 x 50 µl	-25 bis -15 °C
<i>H. pylori</i> IC Target (oranger Verschluss)	Interne Positiv Kontrolle (IC)	1 x 50 µl	-25 bis -15 °C
<i>H. pylori</i> Wild-type Positive Control (roter Verschluss)	Kontroll-DNA <i>H. pylori</i> 23S rRNA Wildtyp (Clarithromycin empfindlich)	1 x 300 µl	-25 bis -15 °C
<i>H. pylori</i> A2142G Positive Control (roter Verschluss)	Kontroll-DNA <i>H. pylori</i> 23S rRNA Mutante (A2142G) (Clarithromycin resistent)	1 x 300 µl	-25 bis -15 °C
HPY Reaction Mix (weißer Verschluss)	4 x Reaktionsmix	1 x 250 µl	-25 bis -15 °C
Nuclease-free water (blauer Verschluss)	Nuklease-freies Wasser	1 x 1000 µl	-25 bis -15 °C

Lieferung und Haltbarkeit

Die Lieferung des Kits erfolgt mit Coolpacks. Bei sachgemäßer Lagerung sind die Kitkomponenten bis zum angegebenen Ablaufdatum haltbar. Kit vor Licht geschützt lagern.

Der Reaktionsmix (weißer Verschluss) sollte auf Eis aufgetaut werden. Um wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden, sollte der Reaktionsmix aliquotiert und auf -25 bis -15 °C gelagert werden.

Qualitätskontrolle Freigabetestung

In Übereinstimmung mit dem ISO 13485-zertifizierten Qualitätsmanagementsystem von ingenetix wird jede Charge anhand vorgegebener Spezifikationen getestet, um eine gleichbleibende Produktqualität zu gewährleisten. Die Qualitätskontrolle erfolgt mit Plasmiden, welche Teile der Erreger DNA enthalten.

6. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Reagenzien und Laborgeräte für DNA-Extraktion, die für die Extraktion des angeführten Probenmaterials geeignet sind
- Nuklease-freies Wasser für Verdünnung der IC
- Puderfreie Laborhandschuhe (Einweghandschuhe)
- Pipetten (einstellbar)
- Pipettenspitzen mit Filter
- Real-time PCR Gerät, welches Fluoreszenz im FAM/SYBR® Green Kanal messen und eine Schmelzkurve aufzeichnen kann (empfohlen werden Geräte der Serie Quantstudio™ (Thermo Fisher Scientific), LightCycler® 480 (Roche), LightCycler® 1.1/1.2/1.5 oder 2.0 Instrument (Roche), ABI® 7500 Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific), Magnetic Induction Cycler (Bio Molecular Systems)
- Geeignete optische 96 Well Reaktionsplatten oder Reaktionsgefäße mit zugehörigem (optischen) Verschlussmaterial

7. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise

7.1 Generelle Hinweise

- In-vitro-Diagnostikum: Dieses Produkt darf nur von Fachpersonal verwendet werden, das auf real-time PCR und *in vitro* Diagnose Verfahren geschult wurde.
- Der Transport von klinischen Proben muss den örtlichen Vorschriften für den Transport von Biologischen Stoffen entsprechen.
- Proben sollten als potenziell infektiös behandelt werden, gemäß den Vorschriften für sicheres Laborarbeiten. Tragen Sie puderfreie Einweghandschuhe bei der Handhabung von klinischem Probenmaterial und Kitreagenzien.
- Probenmaterial, Reagenzien und Abfall sollten gemäß lokalen Sicherheitsbestimmungen entsorgt werden.
- Eine unsachgemäße Entnahme, Beförderung oder Lagerung der Proben kann die Fähigkeit des Assays zum Nachweis der Zielsequenzen beeinträchtigen.
- 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.
- Das real-time PCR Gerät sollte regelmäßig kalibriert, gewartet und gereinigt werden.
- Kitkomponenten sollten vor Licht geschützt werden.
- Reagenzien aus verschiedenen Kits oder Chargen sollten nicht vermischt werden. Beachten Sie das Ablaufdatum des Kits.

7.2 Spezifische Hinweise

Es muss ein Arbeitsablauf eingehalten werden, der falsch positive Ergebnisse aufgrund von Detektion kontaminierender DNA verhindert.

Empfohlene Maßnahmen zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen:

- Separat getrennte Arbeitsbereiche sind für die Aufbereitung des Probenmaterials, Vorbereitung der real-time PCR und Amplifikation nötig. Materialien und Geräte müssen den einzelnen Arbeitsplätzen zugeordnet sein, um den Arbeitsablauf von Prä- zu Post-PCR im Labor zu gewährleisten.
- Labortische und Hilfsmittel müssen regelmäßig gereinigt werden.
- Die Probenaufbereitung sollte in einer Laminar-Flow-Sterilbank erfolgen. Laminar-Flow-Sterilbank regelmäßig in allen Bereichen reinigen.
- Die Vorbereitung der real-time PCR sollte in einer PCR-Workstation erfolgen.
- Nach Möglichkeit Verbrauchsmaterialien und Pipetten in der Laminar-Flow-Sterilbank und in der PCR-Workstation belassen.
- Die Verwendung von sterilen aerosol-resistenten Pipettenspitzen ist erforderlich.

- Nur DNA-freie Verbrauchsmaterialien verwenden.
- Labormantel tragen.
- Nur mit puderfreien Einweghandschuhen arbeiten, beim Anziehen die Handfläche und Finger der Handschuhe außen nicht berühren. Handschuhe öfters wechseln. Um Hautkontakt zu vermeiden, Handschuhe über die Ärmel des Labormantels ziehen. Eventuell Einweg-Ärmelschoner verwenden.
- Nicht den Rand oder das Gewinde von offenen Reagenzgefäßen berühren.
- Beim Hantieren mit den Proben und der Positivkontrolle ist Vorsicht geboten, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Lagern Sie positives oder potenziell positives Material separat von allen anderen Reagenzien.
- Für eine zulässige Interpretation der Ergebnisse muss 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.
- Optional: In jedem PCR-Lauf kann eine PCR-Negativkontrolle (Nuklease-freies Wasser statt Probe, NTC) mitgeführt werden.

8. Grenzen des Verfahrens

- Zuverlässige Ergebnisse mit diesem Test sind nur bei Anwendung sachgemäßer Verfahren für Entnahme, Transport und Lagerung der Proben sowie eines geeigneten DNA-Extraktionsverfahrens gewährleistet.
- Mit diesem Assay wurde die Gewinnung und Detektion von *H. pylori* DNA aus Biopsien der Magenschleimhaut und Stuhlproben validiert.
- Ein negatives Testergebnis schließt die Möglichkeit einer *H. pylori* 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.
- Zur Clarithromycin Resistenztestung werden die drei wichtigsten Punktmutationen an zwei Positionen (A2142C, A2142G, und A2143G) innerhalb der 23S rRNA, welche am häufigsten mit der Clarithromycin-Resistenz von *H. pylori* Isolaten assoziiert sind, detektiert.
- Mischinfektionen von Wildtyp und A2142G oder A2142C können detektiert werden. Es ist aber möglich, dass bei bestimmten Mischungsverhältnissen eine Mischinfektion nicht mehr eindeutig nachgewiesen werden kann. Eine Mischinfektion von Wildtyp und A2143G kann möglicherweise nicht eindeutig erkannt werden.
- Stuhlproben müssen frisch oder eingefroren sein.
- Ergebnisse sollten mit anderen Labordaten und klinischen Parametern im Kontext interpretiert werden.

9. Vorbereitung der Proben

BactoReal® Kit *H. pylori* ClariRes eignet sich für die Untersuchung von DNA-Extrakten aus menschlichen Stuhlproben und Magenbiopsien.

Probenentnahme und Lagerung:

- Magenbiopsien können in Mikrozentrifugenröhrchen mit steriler physiologischer Kochsalzlösung (ca. 100 µl) bei 2-8 °C bis zu 48 Stunden aufbewahrt werden. Wenn die Probenverarbeitung innerhalb von 48 Stunden nicht gewährleistet ist, muss die Probe sofort trocken und ohne Zusatzstoffe bei -20/-80 °C gelagert werden.
- Stuhlproben: Es wird empfohlen, die Proben sofort nach der Entnahme zu verarbeiten. Lagern Sie die Proben in Mikrozentrifugenröhrchen bei 2-8 °C für nicht länger als 48 Stunden oder frieren Sie diese bei -20/-80 °C ein.

Gereinigte DNA sollte bei -25 bis -15 °C gelagert werden.

Extrahieren Sie die Probe mit einem DNA-Extraktionssystem, das mit real-time PCR Technologie kompatibel ist und für die Extraktion des angeführten Probenmaterials geeignet ist. Es muss gewährleistet sein, dass alle bei der Extraktion verwendeten Reagenzien frei von *H. pylori* DNA sind.

- Für manuelle Extraktion empfohlen: QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen) für Stuhlproben und QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) für Biopsien.
- Für automatisiertes Extraktionsverfahren empfohlen: MagNA Pure 24 Total NA Isolation Kit (Roche) mit dem MagNA Pure 24 System (Roche) für Stuhlproben.

In Abhängigkeit vom Protokoll des gewählten Herstellers setzen Sie die angegebene Probenmenge in die Aufreinigung ein und führen die DNA-Isolierung entsprechend der Vorschrift durch.

Der Test wurde mit 100 mg Stuhl als Ausgangsmaterial validiert. Die Verwendung einer zu geringen Menge an Stuhlprobe kann die Sensitivität des Tests beeinflussen. Bei der Verwendung einer zu großen Menge an Stuhlprobe oder Biopsiematerial kann der Test inhibiert werden. In Fall einer Inhibierung muss die Probe 1:5 bis 1:10 verdünnt werden.

Achtung: Die Schmelztemperaturen (Tabelle 1, Tabelle 2) von Wildtyp und Mutanten können sich abhängig vom Extraktionsverfahren ändern. Bei Verwendung von Extraktionsverfahren, die nicht von ingenetix empfohlen werden, muss eine Evaluierung der Extraktionsmethode mit einem *H. pylori* Wildtyp und den Mutanten durchgeführt werden. Dies kann z. B. mit dem DNA Eluat einer *H. pylori* negativen Probe erfolgen, welches mit den Positivkontrollen gespiked wurde.

Es muss immer eine Negativkontrolle der DNA-Extraktion mitgeführt werden (z.B. Extraktion von Wasser anstelle von Probenmaterial).

Qualitätskontrolle für DNA-Extraktion und PCR-Inhibition

Das DNA IPC System (internes DNA-Positivkontrollsystem) dient als Kontrolle für die DNA-Extraktion, identifiziert eine mögliche PCR-Inhibition und bestätigt die Integrität der Kit-Reagenzien.

Eine artifizielle Target DNA (*H. pylori* Internal Positive Control, IC) wird während der Extraktion zugegeben.

Zur Kontrolle der DNA-Extraktion wird die unverdünnte IC während der Extraktion direkt dem Lysepuffer zugesetzt (bzw. Zugabe zur Probe nachdem der Lysepuffer zur Probe pipettiert wurde).

→ Pro Probe Zugabe von 1 µl IC (oranger Verschluss)

Hinweis: Die unverdünnte IC darf nicht direkt dem Probenmaterial in Abwesenheit von Lysepuffer zugesetzt werden, da diese abgebaut werden könnte.

Wenn die IC nicht während der Extraktion zugegeben wurde, kann diese zu einem späteren Zeitpunkt dem PCR-Mastermix als Qualitätskontrolle für die PCR-Reaktion zugegeben werden. In diesem Fall verdünnen Sie das DNA IC Target frisch 1:100 mit Nuklease-freiem Wasser und geben 1 µl der Verdünnung/PCR-Reaktion hinzu.

Achtung: Die IC darf dem Mastermix nicht unverdünnt zugesetzt werden.

10. Vorbereitung der real-time PCR

- Pro PCR-Lauf müssen eine Positivkontrolle (roter Verschluss), eine Negativkontrolle der DNA-Extraktion und optional eine Negativkontrolle der PCR (Nuklease-freies Wasser, blauer Verschluss) mitgeführt werden.
- Es wird dringend empfohlen die PCR der Proben im Doppelansatz anzusetzen, da somit die Nachweiswahrscheinlichkeit von *H. pylori* in Stuhlproben erheblich erhöht wird.
- DNA-Proben auf Eis auftauen.
- Kitkomponenten, wie Assay, IC und Wasser müssen vor dem Ansetzen der Master Mixe vollständig bei Raumtemperatur auftauen. Den Reaktionsmix auf Eis auftauen, vorsichtig mischen, um eine homogene Lösung zu gewährleisten und bis zur Herstellung des Mastermix auf Eis aufbewahren. Nach dem Auftauen werden die einzelnen Komponenten vorsichtig gemischt und kurz mit niedriger Umdrehungszahl abzentrifugiert. Alle Reagenzien sollten vor Testbeginn vollständig aufgetaut sein und gut durchmischt werden. Es wird empfohlen, den HPY Reaktion Mix zu aliquotieren, um mehrere Gefrier-/Auftauzyklen zu vermeiden.
- **Probe**
→ Verwenden Sie 2 µl des DNA-Extrakts aus Stuhlproben oder 5 µl des DNA-Extrakts aus Biopsien.
- **Positivkontrolle**
→ Positivkontrolle immer zuletzt pipettieren. Als Positiv Kontrolle setzen Sie bitte 2 µl oder 5 µl von der *H. pylori* Wild-type Positive Control, oder 2 µl oder 5 µl von der *H. pylori* A2142G PC ein.
- **Negativkontrolle der PCR**
→ Als Negativ-Kontrolle verwenden Sie 2 µl oder 5 µl Nuclease-free water.

10.1. Pipettierschema

Pipettierschema bei Zugabe der IC zur Extraktion

		Pro Probe (Biopsien)	Pro Probe (Stuhl)
Ansetzen Master Mix (gut durchmischen)	Nuclease-free water	9,0 µl	12,0 µl
	HPY Reaction Mix	5,0 µl	5,0 µl
	<i>H. pylori</i> Assay Mix	1,0 µl	1,0 µl
	Gesamtvolumen	15,0 µl	18,0 µl
Ansetzen der PCR-Reaktion	Master Mix	15,0 µl	18,0 µl
	Probe	5,0 µl	2,0 µl
	Gesamtvolumen	20,0 µl	20,0 µl

Pipettierschema bei Zugabe der IC zur PCR-Reaktion

		Pro Probe (Biopsien)	Pro Probe (Stuhl)
Ansetzen Master Mix (gut durchmischen)	Nuclease-free water	8,0 µl	11,0 µl
	HPY Reaction Mix	5,0 µl	5,0 µl
	<i>H. pylori</i> Assay Mix	1,0 µl	1,0 µl
	<i>H. pylori</i> Internal Positive Control; frisch 1:100 verdünnt	1,0 µl	1,0 µl
	Gesamtvolumen	15,0 µl	18,0 µl
Ansetzen der PCR-Reaktion	Master Mix	15,0 µl	18,0 µl
	Probe	5,0 µl	2,0 µl
	Gesamtvolumen	20,0 µl	20,0 µl

→ Falls das DNA IPC Target nicht während der Extraktion zugegeben wurde:

Verdünnen Sie die IC (oranger Verschluss) frisch 1:100 mit Nuklease-freiem Wasser und geben Sie 1 µl pro Probe direkt zum Master Mix zu. In diesem Fall dient die IPC zur Qualitätskontrolle der real-time PCR.

- Bereiten Sie den Master Mix entsprechend der Probenanzahl vor, berücksichtigen Sie dabei ein zusätzliches Volumen von ca. 10%, um eine ausreichende Menge an Master Mix sicherzustellen.
- Pipettieren Sie pro Probe jeweils 15 µl (für Biopsieproben) oder 18 µl (für Stuhlproben) des vorbereiteten Master Mixes in das Well der optischen Reaktionsplatte.
- Geben Sie anschließend 2 µl (bei Stuhlproben) oder 5 µl (bei Biopsieproben) der extrahierten Probe oder der Kontrollen zu. Pipettieren Sie die Positivkontrolle zum Schluss.
- Verschließen Sie die Platte mit einem geeigneten optischen Verschlussmaterial.
- Vortexen Sie die verschlossene Platte für ein 1-2 Sekunden und zentrifugieren Sie die Platte kurz ab.

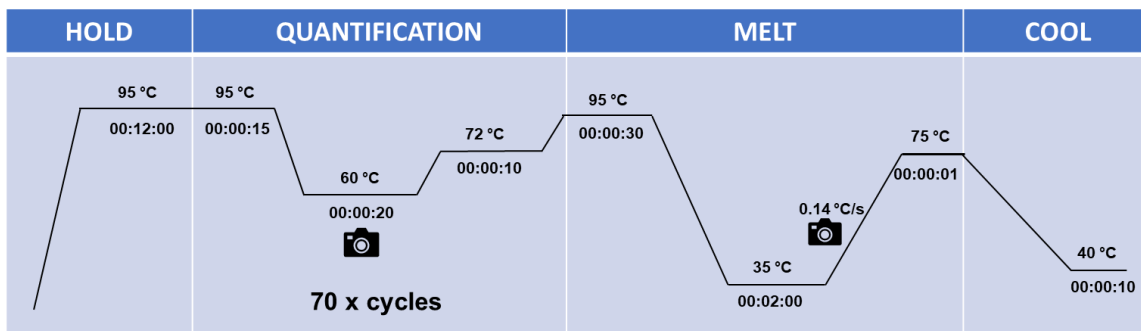
10.2. Programmierung des Temperaturprofils

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

Auswahl der Detektionskanäle:

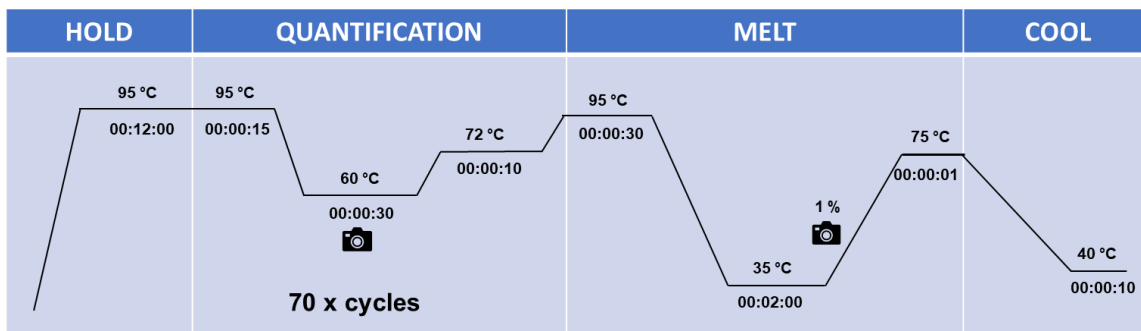
- **Quantstudio™ (Thermo Fisher Scientific):**

Target = SYBR/NONE
Passive Reference = NONE



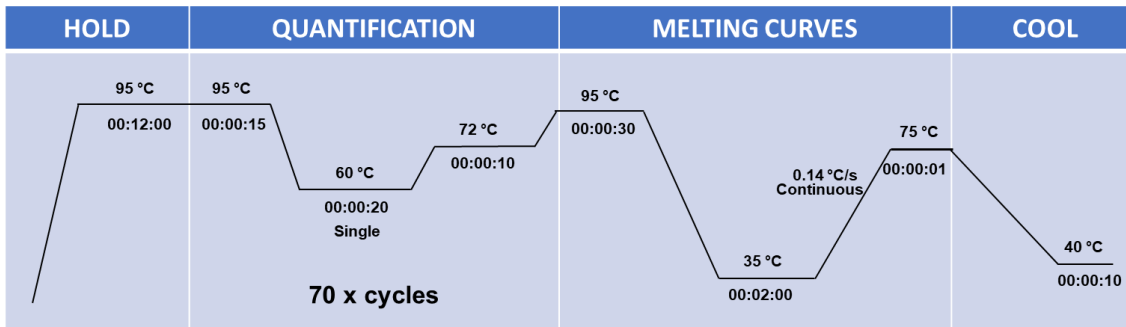
- **ABI® 7500 (Thermo Fisher Scientific):**

Target = SYBR/NONE
Passive Reference = NONE



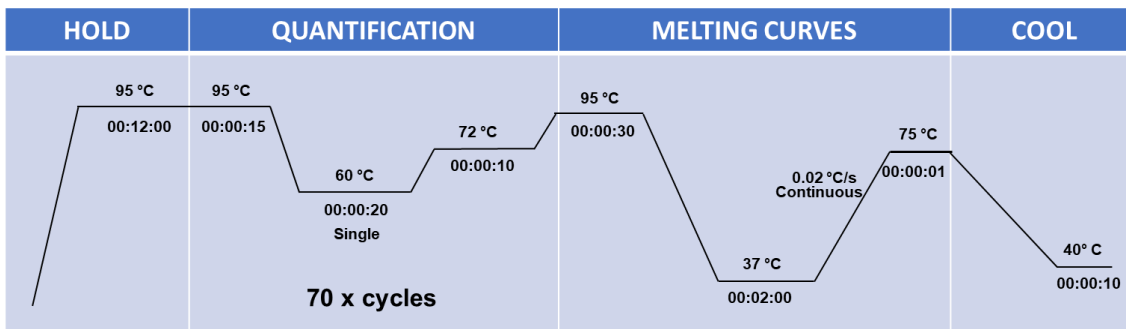
- LightCycler® 480 (Roche):

Target = SYBR Green I / HRM dye



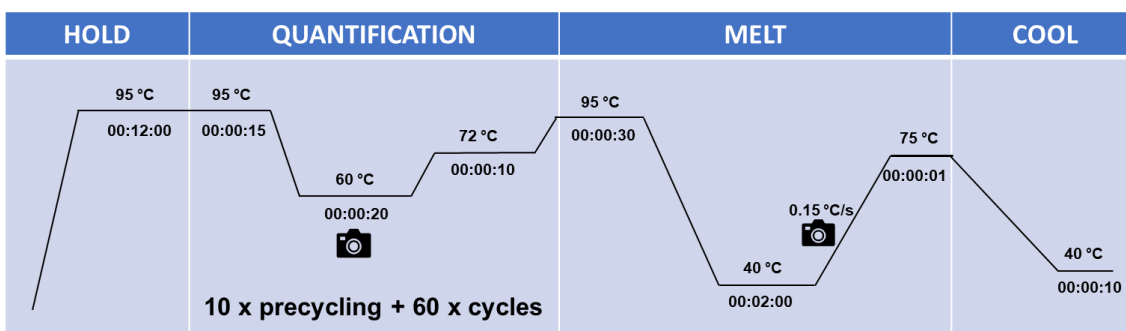
- LightCycler® 2.0 (Roche):

Fluoreszenzkanal 530 nm



- MIC (Bio Molecular Systems):

Target: Green



11. Interpretation der PCR-Daten

Für die Analyse der PCR-Ergebnisse wählen Sie die Fluoreszenzdarstellungs-Optionen FAM/SYBR® Green Kanal.

Die Bewertung der Testergebnisse erfolgt über die Beurteilung der Schmelzkurve. Die Cq Werte der Amplifikationskurve sind bei Wildtyp und Mutanten unterschiedlich und sollten nur als zusätzliche Information, aber nicht zur Interpretation der Ergebnisse dienen. Die Bewertung der Testergebnisse klinischer Proben sollte erst durchgeführt werden, nachdem die Positiv-, Negativkontrollen und die IC ausgewertet wurden und für valid befunden worden sind. Wenn die Resultate der Kontrollen nicht valid sind, können die Patientenergebnisse nicht interpretiert werden.

Tabelle 1 zeigt die Kriterien für valide Kontrollen. Tabelle 2 zeigt die Interpretation der Daten mit klinischen Proben.

Tabelle 1 Interpretation der Kontrollen

	Schmelztemperatur (Tm)	Interpretation
Negative Extraktionskontrolle (NTC)	49-51 °C	Valid
Optional: Negativkontrolle der PCR (NTC)	49-51 °C	Valid
<i>H. pylori</i> Wildtyp Positivkontrolle	62-65 °C	Valid
<i>H. pylori</i> A2142G Positivkontrolle	58-61 °C	Valid

* exakte Tm (°C) abhängig vom Instrument

Nach abgeschlossener Auswertung der PCR-Daten und der Kontrollen können folgende Ergebnisse bei den zu untersuchenden Proben auftreten:

Tabelle 2 Interpretation von Daten klinischer Proben

Schmelztemperatur (Tm)	Nachweis von	Interpretation
49-51 °C	Interne Positiv Kontrolle (IC)	PCR-Reaktion ist nicht inhibiert
62-65 °C	Wildtyp	Probe enthält <i>H. pylori</i> (Clarithromycin empfindlicher Stamm)
57-59 °C	Mutante A2142C	Probe enthält <i>H. pylori</i> (Clarithromycin resistenter Stamm)
58-61 °C	Mutante A2142G	Probe enthält <i>H. pylori</i> (Clarithromycin resistenter Stamm)
59-61 °C	Mutante A2143G	Probe enthält <i>H. pylori</i> (Clarithromycin resistenter Stamm)

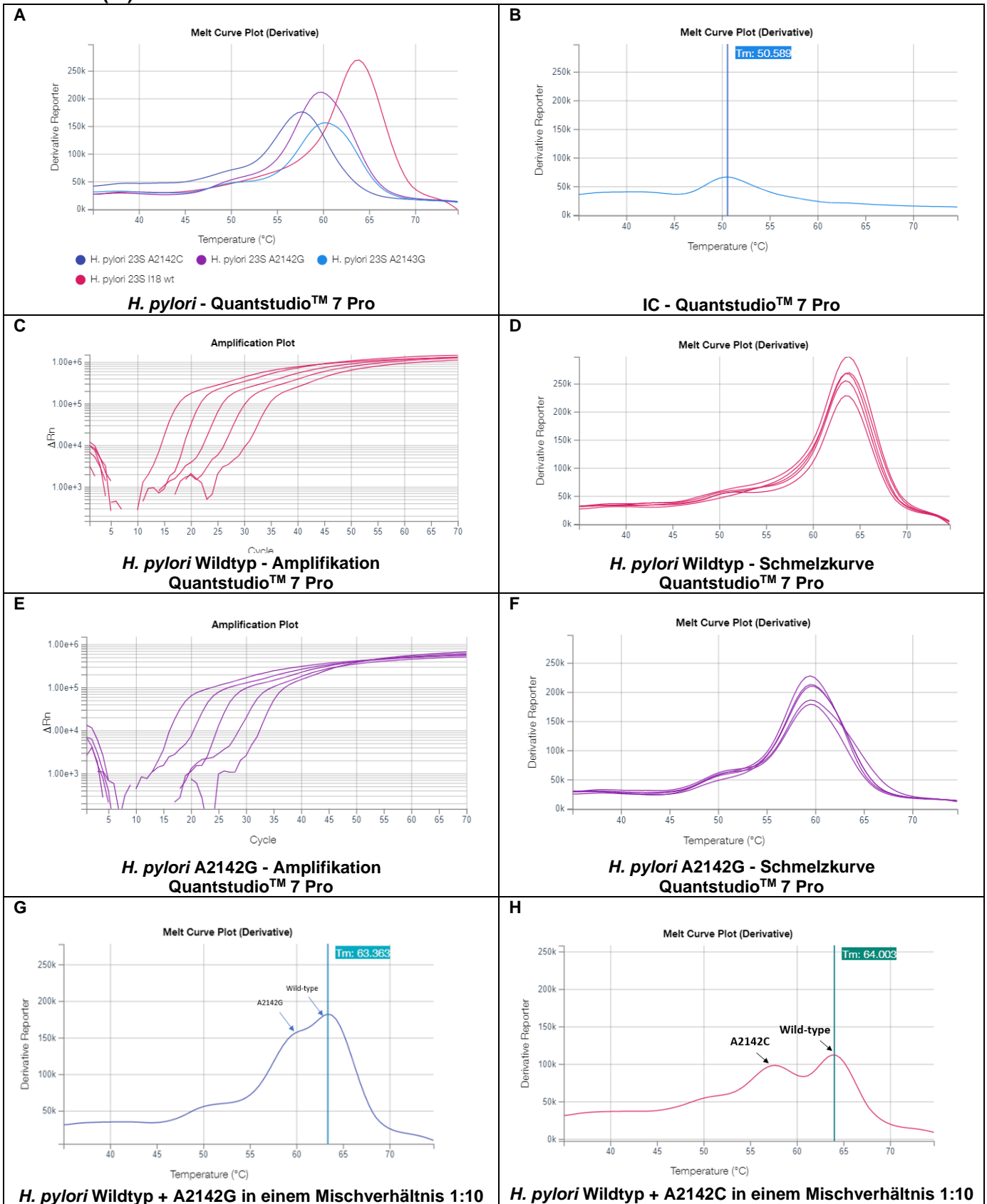
Im Fall eines positiven Nachweises von *H. pylori* ist die Detektion der IC unwesentlich, da eine hohe Ausgangskonzentration an *H. pylori* DNA zu einem reduzierten bis ausbleibenden Fluoreszenz-Signal der Internen Positiv Kontrolle führen kann (Kompetition der PCR).

Analysieren Sie die Stuhlproben immer im Doppelansatz. Wenn zumindest eine Reaktion ein positives Signal für *H. pylori* gibt, sollte die Probe als positiv interpretiert werden.

Bei manchen Patienten kann eine Doppelinfection mit dem Wildtyp und einer Mutante vorliegen. In diesem Fall (Abbildung 1 G, H) kommt es zur Bildung eines Doppelpicks in der Schmelzkurve.

Im Fall von invaliden Daten muss die Analyse mit der restlichen oder einer frisch extrahierten DNA-Probe wiederholt werden (siehe 12. Troubleshooting).

Ergebnisse für *H. pylori* Wildtyp und Clarithromycin-resistenten Mutanten sowie für die Interne Positiv-Kontrolle (IC):



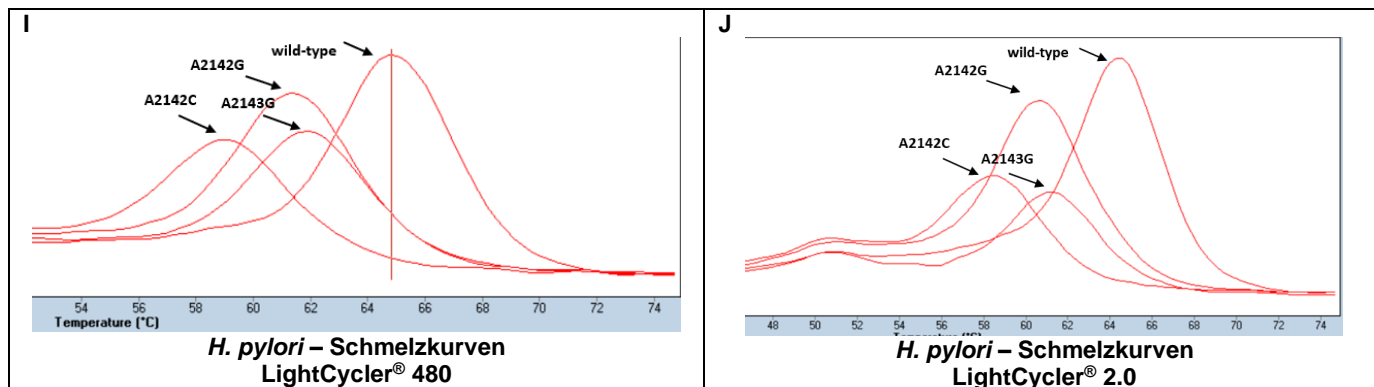


Abbildung 1 Amplifikations- und Schmelzkurven von *H. pylori* DNA

12. Troubleshooting

12.1. Kein *H. pylori* spezifisches Signal bei Positiv Kontrolle

- Die Programmierung des Temperaturprofils des PCR Instruments ist fehlerhaft.
→ Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit den Protokollangaben. Beachten sie, dass die PCR mit **70 Zyklen** durchgeführt wird.
- Fehlerhaftes Zusammenstellen der PCR-Reaktion.
→ Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte mit Hilfe des Pipettierschemas (siehe Vorbereitung der PCR) und wiederholen Sie ggf. die PCR.

12.2. Kein Signal der IC und kein *H. pylori* spezifisches Signal in Patientenprobe

- Die PCR ist teilweise oder komplett inhibiert. Eine Aussage ist nicht möglich.
→ Überprüfen Sie die Arbeitsschritte der DNA-Extraktion
→ Falls bei der DNA-Extraktion keine Fehler nachvollziehbar sind wird empfohlen, die PCR mit einer geringeren Menge an DNA-Eluat (1/5 oder 1/10 des Probenvolumens + die entsprechende Menge Wasser) zu wiederholen.
- Die PCR-Bedingungen entsprechen nicht dem Protokoll.
→ Überprüfen Sie die PCR-Bedingungen und wiederholen Sie die PCR mit korrigierten Einstellungen.

12.3. Breite Schmelzkurve kann auf das Vorhandensein einer Mischinfektion deuten (Abb. 1 G, H)

- Möglicherweise erkennt die Software den zweiten Peak nicht
→ Beurteilen sie die T_m anhand der Peaks in der graphischen Darstellung

12.4. Signal mit T_m zwischen 57 und 65°C bei Negativ Kontrolle der DNA-Extraktion

- Es liegt eine aufreinigungsbefindliche Kontamination vor.
→ Wiederholen Sie die DNA-Extraktion und PCR der zu untersuchenden Proben unter Verwendung noch unbenutzter Reagenzien.
→ Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig dekontaminiert werden.

12.5. Signal mit T_m zwischen 57 und 65°C bei Negativ Kontrolle

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

13. Spezifikationen

13.1. Nachweisgrenze, LoD95%

Methode: BactoReal® Kit *H. pylori* ClariRes wurde mit 10-fach Verdünnungsreihen von Plasmiden und Oligonukleotiden, welche Teile der *H. pylori* DNA enthalten (Wildtyp oder Mutante), getestet.

Resultat: Die analytische Sensitivität (definiert als die kleinste Menge an DNA, die nachgewiesen werden kann) beträgt 10 Targetkopien/Reaktion (entspricht 5 fg *H. pylori* DNA/PCR).

Das LoD95% (LoD95% = kleinste Kopienzahl der Ziel-DNA, die in 95% der Fälle nachgewiesen werden kann) wurde durch Analyse einer Verdünnungsreihe der DNA von *H. pylori* erhoben. Das LoD95 beträgt 16 Targetkopien/Reaktion (entspricht 8 fg *H. pylori* DNA/PCR-Reaktion). Bei Vorliegen einer Mutante kann die Sensitivität 3- bis 10-fach geringer sein.

13.2. Analytische Spezifität

Methode BLAST Analyse: Analytische Spezifität wird durch die Selektion hochspezifischer Primer und Sonden gewährleistet. Die Spezifität der Primer und Sonden wurde *in silico* validiert, indem das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) gegen die NCBI-Datenbank durchgeführt wurde. Primer und Sonden wurden auf potentielle Homologien zu derzeit publizierten Sequenzen untersucht. Diese Analyse validiert den Nachweis derzeit bekannter *H. pylori* Stämme.

Resultat: Bei den BLAST Analysen wurden keine relevanten Sequenzvariabilitäten in der Primer- und Sonden Region von *H. pylori* Stämmen beobachtet. Mittels *in-silico* Analyse zeigt der Test eine 100% Kreuzreaktionen mit *H. fennelliae*, *H. heilmannii*, *H. acinonychis* und *H. ceterum*. *Helicobacter fennelliae* verursacht Gastroenteritis, Proktitis und Bakterämie, während eine Infektion mit *H. heilmannii* zu chronischer Gastritis im Menschen führen kann. *Helicobacter acinonychis* und *H. ceterum* sind für den Menschen klinisch nicht relevant.

Methode Testung Exklusivität: Die analytische Spezifität wurde weiters mit genomischer DNA von *Campylobacter jejuni*, *Corynebacterium diphtheria*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium*, *Bordetella pertussis*, *E. coli* O157 und *Neisseria meningitidis* getestet.

Resultat: Es wurden keine Kreuzreaktionen beobachtet.

13.3. Präzision

Die Variation der Tm lag im Intra-Assay unter 0,2%, im Inter-Assay unter 0,5% und im Inter-Lot unter 0,7%.

13.4. Diagnostische Evaluierung

Methode:

Die diagnostische Evaluierung von BactoReal® Kit *H. pylori* ClariRes wurde von einem externen Dienstleister durchgeführt. Insgesamt wurden 100 DNA-Extrakte aus Magenbiopsien in die Studie eingeschlossen. Diese enthielten 50 Proben *H. pylori* Wildtyp und 40 Proben *H. pylori* Mutanten sowie 10 negative Proben. Die DNA wurde mittels QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) isoliert. Als Vergleich diente eine nach EN ISO 15189 akkreditierte Referenzmethode. Die Testung erfolgte mit einem LightCycler® 480 II System.

Resultat: Alle Proben wurden korrekt erkannt. Die Spezifität und Sensitivität des Tests hinsichtlich der Detektion der Clarithromycin Resistenz lag für Biopsien bei 100%. Siehe Tabelle 3 - Tabelle 6.

Tabelle 3 Gesamtergebnisse von 100 getesteten klinischen Isolaten (Magenbiopsien), 2x2 Kontingenztafel

	Referenz			Total
		pos	neg	
BactoReal® Kit <i>H. pylori</i> ClariRes	pos	90	0	90
	neg	0	10	10
Total		90	10	100

Eine Probe zeigte ein diskrepantes Ergebnis. Diese Probe war negativ mit der akkreditierten Referenzmethode, aber positiv mit BactoReal® Kit *H. pylori* ClariRes und einer weiteren Referenzmethode. In der Wiederholung mit BactoReal® Kit *H. pylori* ClariRes war diese Probe hingegen negativ, was darauf hinweist, dass diese Probe nur eine geringe Menge an *H. pylori* DNA enthielt und somit am Detektionslimit lag.

Tabelle 4 Statistische Auswertung der diagnostischen Validierung (Magenbiopsien)

	Wert	95% CI
Sensitivität	100,00%	95,98% to 100,00%
Spezifität	100,00%	69,15% to 100,00%
NPV	100,00%	
PPV	100,00%	
Prävalenz	90,00%	

Weiters wurden Stuhlproben mit unterschiedlichen Mengen an Wildtyp oder A2143G mutierten *H. pylori* Bakterien versetzt. Zusätzlich wurden 10 negative Stuhlproben mitgeführt. 15 Proben, welche mit Wildtyp *H. pylori* Bakterien versetzt wurden und mit zwei Referenzmethoden sowie *H. pylori* ClariRes Assay (RTGM100) positiv waren, wurden alle mit BactoReal® Kit *H. pylori* ClariRes korrekt erkannt. Es konnten bis zu ca. 20 Genomkopien/Ansatz nachgewiesen werden. Von 13 Proben, welche mit A2143G mutierten *H. pylori* Bakterien versetzt wurden und mit beiden Referenzmethoden positiv waren, wurden 12 korrekt erkannt. Dabei konnten bis zu 200 Genomkopien nachgewiesen werden. 10 negative Stuhlproben waren ebenfalls negativ mit BactoReal® Kit *H. pylori* ClariRes.

Tabelle 5 Gesamtergebnisse von 100 getesteten klinischen Isolaten (Stuhlextrakte), 2x2 Kontingenztafel

	Referenz			Total
		pos	neg	
BactoReal® Kit <i>H. pylori</i> ClariRes	pos	27	0	27
	neg	1	10	11
Total		28	10	38

Tabelle 6 Statistische Auswertung der diagnostischen Validierung (Stuhlextrakte)

	Wert	95% CI
Sensitivität	96,43%	81,65% to 99,91%
Spezifität	100,00%	69,15% to 100,00%
NPV	90,91%	
PPV	100,00%	
Prävalenz	73,68%	

14. Änderungsindex

Änderung	Datum	Beschreibung
1.1de	01.05.2023	Änderung der Firmenadresse 7. Vorsichtsmaßnahmen und Sicherheitshinweise Ergänzung um zusätzliche Informationen zur Probenentnahme und -lagerung, zur Verarbeitung der Proben nach der Entnahme, zu den Lagerbedingungen der Proben, zu den Transport- und Lagerbedingungen der gereinigten DNA. 9. Vorbereitung der Proben Es wird darauf hingewiesen, dass Extraktionsmethoden, die nicht von ingenetix empfohlen werden, mit <i>H. pylori</i> Wildtyp und Mutante validiert werden müssen.

Hinweis:

Alle im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetretenen schwerwiegenden Vorfälle sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und / oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

Technischer Support:

ingenetix GmbH, Haidingergasse 1, 1030 Wien, Österreich

Telefon: +43 (0)1 36 198 0 1; **E-Mail:** office@ingenetix.com