

MutaPLEX[®] MTB

real time PCR kit

*Test für den qualitativen in-vitro-Nachweis von
Mycobacterium-tuberculosis-DNA in klinischen Proben*

*Test for the qualitative in vitro detection of
Mycobacterium tuberculosis DNA in clinical specimens*

Gültig ab / Valid from 2017-07-05



KG190732
KG190796



32/96



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1	VERWENDUNGSZWECK	1
2	EINLEITUNG	1
3	TESTPRINZIP	2
4	INHALT DER TESTPACKUNG	2
5	ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	2
6	TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT	3
7	WICHTIGE HINWEISE	3
8	ALLGEMEINE HINWEISE	3
9	PROBENMATERIAL	4
10	PROBENVORBEREITUNG	4
11	KONTROLL-DNA	4
	<i>DNA-Isolation aus klinischen Proben</i>	<i>4</i>
12	REAL-TIME-PCR	5
	<i>12.1 Wichtige Hinweise vor Beginn</i>	<i>5</i>
	<i>12.2 Durchführung</i>	<i>5</i>
	<i>12.3 Geräteeinstellungen</i>	<i>7</i>
13	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	8
14	VALIDIERUNGSDATEN	9
15	EINSCHRÄNKUNGEN	10
16	PROBLEMBEHANDLUNG	10
17	LEISTUNGSDATEN	12
	<i>17.1 Diagnostische Sensitivität und Spezifität</i>	<i>12</i>
	<i>17.2 Analytische Sensitivität</i>	<i>13</i>
	<i>17.3 Analytische Spezifität</i>	<i>13</i>
18	ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	15
19.	LITERATUR	15

1 VERWENDUNGSZWECK

Der MutaPLEX® MTB Real-time-PCR-Kit dient dem Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis*-DNA in klinischen Proben mittels Real-time-PCR in offenen Real-time-PCR-Systemen.

2 EINLEITUNG

Mycobacterium tuberculosis bildet zusammen mit sechs weiteren verwandten Bakterien den M.-tuberculosis-Komplex. Mitglieder dieses Komplexes sind *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium africanum*, die Menschen infizieren, *Mycobacterium microti*, welches Wühlmäuse befällt, *Mycobacterium bovis*, an dem Säugerspezies inklusive des Menschen erkranken, *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin), eine als Lebendimpfstoff verwendete Variante von *Mycobacterium bovis*, und *Mycobacterium canettii*, ein weiteres humanpathogenes Bakterium.

Tuberkulose (TB) ist eine Erkrankung, die durch Infektion mit dem Bakterium *M. tuberculosis* hervorgerufen wird, und die ohne Behandlung tödlich verlaufen kann. Aktuelle Daten der Weltgesundheitsorganisation WHO schätzen die Zahl der Infizierten weltweit auf über 13 Millionen, ca. 1,5 Millionen Menschen sterben jährlich an der Krankheit. Die häufigste Form der Tuberkulose ist die Lungentuberkulose. An Lungentuberkulose erkrankte Patienten leiden üblicherweise an Husten, zeigen abnormale Röntgenbefunde des Brustbereichs und sind ansteckend. Hustet, niest oder spricht eine an aktiver Lungentuberkulose leidende Person, können sich die Bakterien über die Luft verteilen. Atmen gesunde Personen die Bakterien ein, besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass sie sich mit Tuberkulose anstecken. Hierfür ist jedoch üblicherweise eine wiederholte Exposition vonnöten (1).

Tuberkulose kann sich auch außerhalb der Lungen (extrapulmonar) manifestieren, dann zumeist im Zentralnerven-, Lymph- oder Urogenitalsystem, aber auch in Knochen und Gelenken. Kommt es bei geschwächten Personen, vorwiegend immunsupprimierten Patienten und Kindern, zu einer Aussaat der Mykobakterien über die Blutbahn mit Beteiligung beider Lungenhälften und vieler Organe gleichzeitig, spricht man von einer Miliartuberkulose.

Eine Infektion mit Tuberkulosebakterien führt jedoch nicht zwangsweise zum Ausbruch der Erkrankung, nur ca. 5 % der Tuberkuloseinfizierten erkranken tatsächlich. Die übrigen Personen haben eine latente Tuberkuloseinfektion, sind asymptomatisch, fühlen sich nicht krank und sind nicht ansteckend.

3 TESTPRINZIP

Der MutaPLEX® MTB Real-time-PCR-Kit enthält spezifische Primer und fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sonden sowie zusätzliches Material für den Nachweis von MTB-DNA in klinischen Proben.

Die Detektion der Amplifikation erfolgt in Echtzeit durch die Hybridisierung und anschließende Hydrolyse der erregerspezifischen Fluoreszenzsonden. Die Detektion erfolgt im FAM-Kanal.

Zusätzlich verfügt der MutaPLEX® MTB Real-time-PCR-Kit über eine Kontroll-DNA, die während der Extraktion zugefügt und in einem heterologen Amplifikationssystem nachgewiesen wird. Dies ermöglicht zum Einen das Aufdecken von Fehlern bei der DNA-Extraktion, zum Anderen kann eine mögliche Inhibition der PCR identifiziert werden. Dadurch wird das Risiko von falsch negativen Ergebnissen reduziert. Die Detektion der DNA-Extraktionskontrolle erfolgt im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal.

4 INHALT DER TESTPACKUNG

Die mitgelieferten Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 96 (KG190796) bzw. 32 (KG190732) Nachweisreaktionen.

Tabelle 1: Inhalt des MutaPLEX® MTB Real-time-PCR-Kits

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt	
		32	96
Reaction Mix	gelb	1 x 512 µl	2 x 768 µl
Positive control	rot	1 x 50 µl	1 x 100 µl
Negative control	grün	1 x 50 µl	1 x 100 µl
Control DNA	transparent	1 x 160 µl	2 x 240 µl

5 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- DNA-Extraktionskit (z.B. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038, oder MutaCLEAN® Mag RNA/DNA, KG1023 / KG1024)
- Steriles Wasser, geeignet für PCR-Anwendung
- Sterile Reaktionsgefäße
- Pipetten (variable Volumina)
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Tischzentrifuge
- Vortex-Wirbelmischer
- Real-time-PCR-Gerät

- optische PCR-Gefäße mit Deckel
- optional: Pipettiergeräte zur Automation
- optional: BLP-DNA (bakterienähnliche Partikel, Details siehe Kapitel 11)

6 TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT

Der Transport des MutaPLEX® MTB Real-time-PCR-Kit erfolgt gefroren auf Trockeneis. Alle Komponenten sind direkt nach Erhalt lichtgeschützt bei -20°C zu lagern. Nach Ablauf des auf der Packung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.

Nach Anbruch der Reagenzien sind diese für maximal sechs Monate verwendbar. Bis zu 20 Frier-Tau-Zyklen sind möglich.

Schützen Sie den Test während der gesamten Testlaufzeit vor direkter Sonneneinstrahlung.

7 WICHTIGE HINWEISE

- Die MutaPLEX® MTB Real-time-PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Die Richtlinien der *Good Laboratory Practice* (GLP) sind einzuhalten.
- Alle Proben müssen als potentiell infektiös betrachtet werden und alle mit den Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potentiell kontaminiert erachtet werden.

8 ALLGEMEINE HINWEISE

- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Areale für die Probenvorbereitung und den Ansatz des PCR-Master-Mix sollten strikt getrennt sein.
- Pipetten, Röhrchen und andere Arbeitsmaterialien dürfen nicht von einem Bereich in den anderen zirkulieren.
- Immer Pipettenspitzen mit Filtern verwenden.
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.

9 PROBENMATERIAL

Das Ausgangsmaterial für die Nachweisreaktion ist DNA, die aus klinischen Proben (z. B. Rachen-, Nasenabstriche, Bronchiallavagen, Speichelproben) isoliert wurde.

10 PROBENVORBEREITUNG

Die MutaPLEX® MTB Real-time-PCR ist geeignet für den Nachweis von MTB-DNA, die zuvor aus mit Hilfe geeigneter Methoden aus Proben isoliert wurde. Kommerziell erhältliche Extraktionskits können zur DNA-Isolierung verwendet werden. Immun Diagnostik empfiehlt MutaCLEAN® Universal DNA/DNA (KG1038) oder MutaCLEAN® Mag RNA/DNA (KG1023 / KG1024).

Wichtig: Unabhängig vom verwendeten Probenmaterial sollte zusätzlich zu den Proben eine Wasserkontrolle (steriles Wasser) extrahiert werden, anhand derer sich eventuell auftretende Inhibitionen und Kontaminationen ablesen lassen. Diese Wasserkontrolle muss analog einer Probe behandelt werden.

Beachten Sie bitte auch Kapitel 11 (Kontroll-DNA).

Falls die Real-time-PCR nicht sofort durchgeführt wird, müssen die DNA-Extrakte entsprechend den Angaben des DNA-Extraktionskitherstellers aufbewahrt werden.

11 KONTROLL-DNA

Der MutaPLEX® MTB Real-time-PCR enthält eine Kontroll-DNA, die zum einen als DNA-Extraktionskontrolle dient, zum anderen als interne Kontrolle mögliche Inhibitionen der Real-time-PCR aufzeigt.

Die bakterienähnlichen Partikel (*bacterium-like particles*, BLP) sind nicht im Kit enthalten.

DNA-Isolation aus klinischen Proben

a) Kontroll-DNA oder BLP-DNA als Extraktionskontrolle

MutaPLEX® MTB Kontroll-DNA oder BLP-DNA zur DNA-Extraktion geben.

5 µl Kontroll-DNA oder BLP-DNA zu jeder Extraktion zugeben (5 µl x (N+1)), gut mischen. Führen Sie die DNA-Isolation gemäß der Anleitung des Herstellers durch. Setzen Sie anschließend die Real-time-PCR nach Protokoll A an.

Die Kontroll-DNA muss dem Lysepuffer des Extraktionskits zugesetzt werden.

b) Kontroll-DNA als interne Kontrolle der Real-time-PCR

Sollte keine Kontrolle der DNA-Extraktion gewünscht sein, wohl aber eine Kontrolle der PCR, so kann die Kontroll-DNA erst beim Ansetzen der PCR zugegeben werden. In diesem Fall ist die Real-time-PCR nach Protokoll B anzusetzen.

12 REAL-TIME-PCR

12.1 Wichtige Hinweise vor Beginn

- Bitte beachten Sie Kapitel 7 („Wichtige Hinweise“).
- Bevor Sie die PCR ansetzen, machen Sie sich mit dem Real-time-PCR-Gerät vertraut.
- Die Programmierung des Temperaturprofils sollte abgeschlossen sein, bevor die PCR angesetzt wird.
- Beachten Sie, dass in jedem PCR-Lauf mindestens eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle enthalten sein sollte.
- Alle Reagenzien müssen komplett aufgetaut, gemischt (Reaktions-Mix nicht vortexen, sondern durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren mischen) und kurz anzentrifugiert werden.
- Wir empfehlen, die Reagenzien stets in einem Kühlblock (+2 bis +8°C) oder auf Eis zu kühlen.

12.2 Durchführung

Falls die Kontroll-DNA oder BLP-DNA als echte Extraktionskontrolle verwendet wird, bitte Protokoll A folgen. Wird die Kontroll-DNA lediglich zur Kontrolle einer möglichen Inhibition der Real-time-PCR verwendet, bitte Protokoll B befolgen.

Protokoll A

Die Kontroll-DNA oder BLP-DNA wurde bereits zur DNA-Extraktion zugegeben (siehe Kapitel 11 „Kontroll-DNA“). In diesem Fall wird der Master-Mix gemäß Tabelle 2 angesetzt.

Der Master-Mix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

Tabelle 2: Herstellung des Master-Mix (Kontroll-DNA wurde während der DNA-Extraktion zugefügt)

Reaktionsvolumen	Master-Mix-Volumen
16 µl Reaction Mix	16 µl x (N+1)

Protokoll B

Die Kontroll-DNA wird ausschließlich zur Kontrolle der Real-time-PCR verwendet (siehe Kapitel 11 „Kontroll-DNA“). In diesem Fall wird der Master-Mix gemäß Tabelle 3 angesetzt.

Der Master-Mix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

Tabelle 3: Herstellung des Master-Mix (die Kontroll-DNA wird dem Master-Mix beigemischt)

Reaktionsvolumen	Master-Mix-Volumen
16 µl Reaction Mix	16 µl x (N+1)
0,5 µl Control DNA *	0,5 µl x (N+1)*

* Die durch Zugabe der Kontroll-DNA verursachte Volumenerhöhung kann vernachlässigt werden. Die Sensitivität des Nachweissystems ist dadurch nicht beeinträchtigt.

Protokoll A und B: Ansetzen der Real-time-PCR

- Benötigte Anzahl optischer PCR-Reaktionsgefäße in den Kühlblock des Real-time-PCR-Geräts stellen.
- 16 µl des Master-Mix in jedes Gefäß pipettieren.
- 4 µl der DNA-Eluate (inklusive des Eluats der Wasserkontrolle), die Positivkontrolle und die Negativkontrolle in die entsprechenden Gefäße pipettieren (Tabelle 4).
- Die Reaktionsgefäße sofort nachdem die Probe zugefügt wurde verschließen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.

Tabelle 4: Ansetzen der Real-time-PCR

Komponente	Volumen
Master-Mix	16,0 µl
Probe	4,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

12.3 Geräteeinstellungen

Für die Real-time-PCR ist das in Tabelle 5 beschriebene Temperaturprofil zu benutzen.

Tabelle 5: Real-time-PCR-Temperaturprofil

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Zyklenanzahl
Reverse Transkription	10 min	45 °C	1
Initiale Denaturierung	5 min	95 °C	1
cDNA-Amplifikation			45
Denaturierung	10 s	95 °C	
Annealing und Verlängerung	40 s	60 °C	
Messung am Ende dieses Schrittes			

Abhängig vom verwendeten Real-time-Gerät müssen noch weitere, in Tabelle 6 aufgelistete Einstellungen vorgenommen werden.

Tabelle 6: Überblick über die für die MutaPLEX® MTB Real-time-PCR benötigten Geräteeinstellungen

Real-time-Gerät	Parameter	Detektionskanal	Bemerkungen	
LightCycler 480I	MTB Kontroll-DNA	483–533 523–568	vorinstallierte Farbkompensation <i>universal color compensation</i> FAM (510) – VIC (580)	
LightCycler 480II	MTB Kontroll-DNA	FAM (465–510) HEX (533–580)		
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	MTB Kontroll-DNA	FAM HEX	Gain 8 Gain 1	Reference Dye: None
ABI 7500	MTB Kontroll-DNA	FAM JOE	Option Reference Dye ROX: NO	
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000	MTB Kontroll-DNA	Grün Gelb	Gain 5 Gain 5	

13 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die MTB-spezifische Amplifikation wird im FAM-Kanal detektiert. Die Amplifikation der Kontroll-DNA wird im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal gemessen.

Folgende Ergebnisse können auftreten:

- **Im FAM-Kanal wird ein Signal detektiert:**

Das Ergebnis ist positiv, die Probe enthält MTB-DNA.

In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal nicht notwendig, da eine hohe MTB-DNA-Konzentration zu einem verminderten bzw. fehlenden Fluoreszenzsignal der Kontroll-DNA führen kann (Kompetition).

- **Im FAM-Kanal wird kein Signal detektiert, jedoch im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal:**

Das Ergebnis ist negativ, die Probe enthält keine MTB-DNA.

Das detektierte Signal der Kontroll-DNA schließt die Möglichkeit einer fehlerhaften DNA-Extraktion aus (falls die Kontroll-DNA als Extraktionskontrolle benutzt wurde). Außerdem ist die PCR nicht inhibiert. Unterscheidet sich der CT-Wert der internen Kontrolle der Wasserkontrolle stark von dem der Probe, so liegt eine teilweise Inhibition vor, die dazu führen kann, dass schwach positive Proben nicht erkannt werden (siehe Kapitel „Problembehandlung“).

- **Weder im FAM- noch im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal wird ein Signal detektiert:**

Es kann keine diagnostische Aussage getroffen werden.

Die Real-time-PCR wurde inhibiert oder es trat ein Fehler bei der DNA-Extraktion auf. Wurde die Kontroll-DNA während der DNA-Extraktion zugefügt und nicht direkt in den PCR-Master-Mix gegeben, dann ist die negative Kontrolle in beiden Kanälen negativ.

Abbildung 1 und Abbildung 2 zeigen Beispiele für positive und negative Real-time-PCR-Ergebnisse.

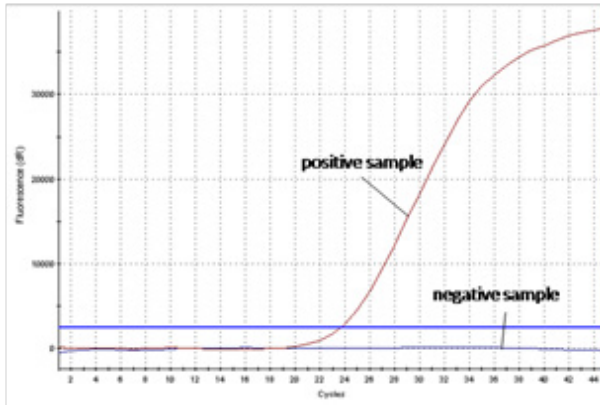


Abb. 1: Die positive Probe zeigt eine starke Amplifikation im MTB-spezifischen FAM-Kanal, während bei der negativen Probe kein Fluoreszenzsignal detektiert wird.

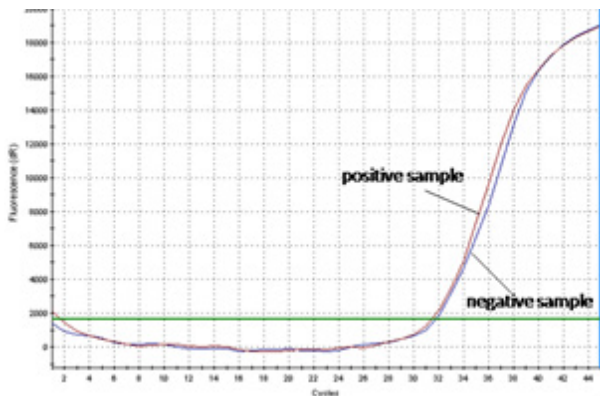


Abb. 2: Im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal zeigen sowohl die positive als auch die negative Probe ein Signal. In diesem Fall liegt keine Inhibition der Real-time-PCR vor, auch verlief die DNA-Extraktion erfolgreich. Die negative Probe ist somit als tatsächlich negativ zu werten.

14 VALIDIERUNGSDATEN

Stellen Sie die Grenzwerte des Real-time-Geräts wie im Folgenden beschrieben ein.

Negativkontrollen

Alle Negativkontrollen sollten unter dem Grenzwert liegen. Im Falle einer möglichen Kontamination (Auftreten einer Kurve in der Negativkontrolle oder einer Anhäufung von Kurven in Proben mit hohem C_T , beispielsweise über 36) sind die erhaltenen Er-

gebnisse nicht interpretierbar und der gesamte Lauf (inklusive der Extraktion) muss wiederholt werden.

Positivkontrollen

Alle Positivkontrollen müssen eine positive, d.h. exponentielle Amplifikationskurve aufweisen. Die Positivkontrollen müssen unter einen C_T -Wert von 30 fallen.

Interne Kontrollen

Alle internen Kontrollen müssen eine positive, d.h. exponentielle Amplifikationskurve aufweisen. Der C_T -Wert der internen Kontrolle muss unter 33 liegen. Falls der C_T -Wert der internen Kontrolle über 34 liegt, deutet dies auf ein DNA-Aufreinigungsproblem oder eine stark positive Probe hin, welche die interne Kontrolle inhibieren kann. In letzterem Fall ist das Testergebnis valide. Falls eine Wasserkontrolle durchgeführt wurde, muss der C_T -Wert der internen Kontrolle unter 33 liegen.

15 EINSCHRÄNKUNGEN

Die Ergebnisse müssen stets im Kontext der klinischen Symptome betrachtet werden. Therapeutische Entscheidungen sollten unter Berücksichtigung klinischer Daten getroffen werden.

Ein negatives Testergebnis schließt eine MTB-Infektion nicht aus.

16 PROBLEMBEHANDLUNG

Die folgenden Problembeschreibungen sollen bei eventuell auftretenden Problemen mit der Real-time-PCR behilflich sein. Sollten Sie weitere Fragen, haben wenden Sie sich bitte direkt an Immundiagnostik.

Kein Fluoreszenzsignal im FAM-Kanal der Positivkontrolle

Der gewählte entspricht nicht dem im Protokoll angegebenen Kanal

Wählen Sie den FAM-Kanal für die Analyse der MTB-spezifischen Amplifikation und den VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal für die Amplifikation der Kontroll-DNA .

Fehlerhaftes Ansetzen der Real-time-PCR

Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte und vergleichen Sie diese mit den im Kapitel „Durchführung“ beschriebenen Schritten.

Fehlerhaftes Real-time-PCR-Temperaturprofil

Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll (Tabelle 5).

Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum

Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kit-etikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie im Kapitel „Transport und Lagerung“ beschrieben.

Schwaches oder kein Signal der Kontroll-DNA und gleichzeitiges Ausbleiben eines Signals im FAM-Kanal***Die Real-time-PCR-Bedingungen stimmen nicht mit den im Protokoll beschriebenen überein***

Überprüfen Sie die Real-time-PCR-Bedingungen (Kapitel 12).

Real-time-PCR-Inhibition

Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode benutzen (siehe Kapitel „Probenvorbereitung“). Beachten Sie die Herstellerangaben. Stellen Sie sicher, dass ethanolhaltige Waschpuffer vollständig entfernt wurden (ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt bei hoher Geschwindigkeit vor der DNA-Elution wird empfohlen).

Verlust der DNA während des Aufarbeitungsprozesses

Falls die Kontroll-DNA vor der Extraktion zugefügt wurde, kann das Ausbleiben des Signals auf eine fehlerhafte DNA-Extraktion hinweisen. Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode verwenden und beachten Sie die Herstellerangaben.

Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum

Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kit-etikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie im Kapitel „Transport und Lagerung“ beschrieben.

Detektion eines Signals im FAM-Kanal der Negativkontrolle***Kontamination des Real-time-PCR-Ansatzes***

Wiederholen Sie die Real-time-PCR in Replikaten. Falls das Ergebnis der Wiederholungen negativ sein sollte, so ereignete sich die Kontamination während der Befüllung der Reaktionsgefäße. Stellen Sie sicher, dass Sie die Positivkontrolle zuletzt pipettieren und verschließen Sie die Reaktionsgefäße sofort nachdem Sie die jeweilige Probe zugegeben haben. Falls die Negativkontrolle in der Wiederholung wieder ein Signal im FAM-Kanal ergibt, deutet dies darauf hin, dass eine oder mehrere Kitkomponenten kontaminiert sind. Stellen Sie sicher, dass

die Arbeitsbereiche und die Geräte regelmäßig dekontaminiert werden. Wiederholen Sie die Real-time-PCR mit einem neuen Kit.

17 LEISTUNGSDATEN

17.1 Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Während der Validierungsstudie des MutaPLEX® MTB Real-time-PCR-Kits wurden 11 positive und 13 negative Proben getestet. Der Wert für sowohl diagnostische Spezifität als auch Sensitivität wurde mit 100 % bestimmt (Tabelle 7).

Sowohl der positive als auch der negative Vorhersagewert liegen bei 100 %.

Tabelle 7: Übersicht über getestete Probenanzahl sowie sich daraus ergebende positive und negative Vorhersagewerte.

	Positive Proben	Negative Proben
MutaPLEX® MTB positiv	11	0
MutaPLEX® MTB negativ	0	13
Sensitivität	100 %	
Spezifität	100 %	

Im Zuge der Validierung des MutaPlex® MTB Real-time-PCR-Kits wurden Ringversuchsproben analysiert. Tabelle 8 zeigt das Ergebnis des Ringversuchs.

Tabelle 8: Ergebnisse des MutaPLEX® MTB Real-time-PCR-Kits im MTB-Ringversuch

Probe	Probeninhalt	erwartetes Ergebnis	Ergebnis	Probentyp
MTBDNA14-01	<i>M.-tuberculosis</i> -Komplex	positiv	positiv	core
MTBDNA14-02	Mycobacterium-negativ	negativ	negativ	core
MTBDNA14-03	<i>M.-tuberculosis</i> -Komplex	positiv	positiv	core
MTBDNA14-04	<i>M.-tuberculosis</i> -Komplex	positiv	positiv	educational
MTBDNA14-05	<i>M. xenopi</i>	negativ	negativ	educational
MTBDNA14-06	<i>M.-tuberculosis</i> -Komplex	positiv	positiv	core

Probe	Probeninhalt	erwartetes Ergebnis	Ergebnis	Probentyp
MTBDNA14-07	<i>M.-tuberculosis</i> -Komplex	positiv	positiv	educational
MTBDNA14-08	<i>M.-tuberculosis</i> -Komplex	positiv	positiv	core
MTBDNA14-09	Mycobacterium negative	negativ	negativ	core
MTBDNA14-10	<i>M.-tuberculosis</i> -Komplex	positiv	positiv	core

17.2 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des MutaPLEX® MTB Real-time-PCR-Kits wurde anhand serieller Verdünnungen von Ziel-DNA-Sequenzen mittels eines Stratagene Mx3000 Real-time-PCR-Geräts ermittelt. Die LoD des MutaPLEX® MTB Real-time-PCR-Kits beträgt ≤ 1 Ziel-DNA-Kopie pro Reaktion.

17.3 Analytische Spezifität















Die Spezifität des MutaPLEX® MTB Real-time-PCR-Kits wurde zusätzlich anhand der in Tabelle 9 gelisteten Spezies bestimmt. Der MutaPLEX® MTB Real-time-PCR-Kit ergab positive Ergebnisse für Proben, die MTB enthielten, und zuverlässig negative Ergebnisse für Proben mit anderen Pathogenen.

Tabelle 9: Zur Bestimmung der analytischen Spezifität des MutaPLEX® MTB Real-time-PCR-Kits eingesetzte bakterielle und virale Pathogene

Spezies	erwartetes Ergebnis	Ergebnis
Influenzavirus A A/ Brisbane H1N1 59/2007 E40/08	negativ	negativ
Influenzavirus A Indonesia H5N1 05/2005	negativ	negativ
Influenzavirus A New Caledonia 20/99 H1N1	negativ	negativ
Influenzavirus A Panama H3N2 2007/99	negativ	negativ
Influenzavirus B B/ Brisbane 60/2008 E09/09	negativ	negativ
Influenzavirus B Jiangsu 10/2003	negativ	negativ

Spezies	erwartetes Ergebnis	Ergebnis
RSV-Stamm A2 ATCC-VR-1540	negativ	negativ
RSV-Stamm B WV/14617/85 ATCC-VR-1400	negativ	negativ
Parainfluenzavirus Typ 3 Stamm C243 VR93	negativ	negativ
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ATCC 15531	negativ	negativ
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> Stamm CM-1, ATCC-VR-1360	negativ	negativ
Adenovirus	negativ	negativ
<i>Legionella pneumophila</i> Serogruppe 2	negativ	negativ
Rhinovirus Typ 3 FEBVR483	negativ	negativ
<i>Streptococcus agalactiae</i>	negativ	negativ
Coxsackievirus B5	negativ	negativ
MRSA	negativ	negativ
<i>M.-tuberculosis</i> -Komplex	positiv	positiv

18 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

DNA	Desoxyribonukleinsäure	BLP	Bakterienähnliche Partikel
C_T	Cycle Threshold		Kontroll-DNA
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		Zu verwenden mit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		Katalognummer
	Negativkontrolle		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Positivkontrolle		Obere Temperaturgrenze
	Reaktionsmix		Hersteller
	Inhalt		Verwendbar bis
	Arbeitsanleitung beachten		Chargennummer
			<i>In-vitro</i> -Diagnostikum

19. LITERATUR

- Centers for Disease Control and Prevention (2016), Division of Tuberculosis Elimination (DTBE). <https://www.cdc.gov/tb/default.htm>

MutaPLEX[®] MTB

real time PCR kit

*Test for the qualitative in vitro detection of
Mycobacterium tuberculosis DNA in clinical specimens*

Valid from 2017-07-05



KG190732
KG190796



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1	INTENDED USE	20
2	PATHOGEN INFORMATION	20
3	PRINCIPLE OF THE TEST	20
4	PACKAGE CONTENTS	21
5	EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER	21
6	TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY	21
7	IMPORTANT NOTES	22
8	GENERAL PRECAUTIONS	22
9	SAMPLE MATERIAL	22
10	SAMPLE PREPARATION	22
11	CONTROL DNA	23
	<i>DNA isolation from clinical samples</i>	23
12	REAL TIME PCR	23
	12.1 <i>Important Points Before Starting</i>	23
	12.2 <i>Procedure</i>	24
	12.3 <i>Instrument settings</i>	25
13	DATA ANALYSIS	26
14	ASSAY VALIDATION	28
15	LIMITATIONS OF THE METHOD	29
16	TROUBLESHOOTING	29
17	KIT PERFORMANCE	30
	17.1 <i>Diagnostic Sensitivity and Specificity</i>	30
	17.2 <i>Analytical Sensitivity</i>	31
	17.3 <i>Analytical Specificity</i>	31
18	ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	33
19.	LITERATURE	33

1 INTENDED USE

The MutaPLEX® MTB real time PCR™ is an assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical specimens.

2 PATHOGEN INFORMATION

Mycobacterium tuberculosis forms a complex with other higher related bacteria called the *M. tuberculosis* complex that consists of 6 members: *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium africanum*, which infect humans; *Mycobacterium microti*, which infects vole; *Mycobacterium bovis*, which infects other mammalian species as well as humans; *M. bovis* BCG, a variant of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium canettii*, a pathogen that infects humans. Tuberculosis (TB) is a disease caused by infection from the bacteria *M. tuberculosis*. If not treated properly, TB can be fatal. Currently, the World Health Organization estimates that over 13 million people have TB and about 1.5 million die each year from the disease. Tuberculosis most commonly affects the lungs (pulmonary TB). Patients with active pulmonary TB usually have a cough, an abnormal chest x-ray, and are infectious. TB can also occur outside of the lungs (extrapulmonary), most commonly in the central nervous, lymphatic, or genitourinary systems, or in the bones and joints. Tuberculosis which occurs scattered throughout the body is referred to as miliary TB. Extrapulmonary TB is more common in immunosuppressed persons and in young children. When a person with active pulmonary TB coughs, sneezes, or talks, the bacteria that cause TB may spread throughout the air. If another person breathes in these bacteria, there is a chance that they will become infected with tuberculosis. Repeated contact is usually required for infection (1). However, not everyone infected with TB bacteria becomes sick. Roughly 5% of people infected with *M. tuberculosis* actually develop TB. People who are infected but not sick have latent TB infection. Those who have a latent infection are asymptomatic, do not feel sick, and are not contagious.

3 PRINCIPLE OF THE TEST

The MutaPLEX® MTB real time PCR kit contains specific primers and dual-labelled probes for the amplification and detection of MTB DNA in clinical specimens. The presence of nucleic acid is detected by an increase in fluorescence due to hydrolysis of the probes during amplification.

The fluorescence of the pathogen-specific probes is measured in the FAM channel.

Furthermore, MutaPLEX® MTB real time PCR kit contains a control DNA, which is added during DNA extraction and detected in the same reaction by a differently labelled probe.

The control DNA allows the detection of PCR inhibition and acts as control for the isolation of the nucleic acid from the clinical specimen.

The fluorescence of the control DNA is measured in the VIC®/HEX/JOE/TET channel.

4 PACKAGE CONTENTS

The reagents supplied are sufficient for 32 (KG190732) or 96 (KG190796) reactions, respectively.

Table 1: Components of the MutaPLEX® MTB real time PCR kit.

Label	Lid Colour	Content	
		32	96
Reaction Mix	yellow	1 x 512 µl	2 x 768 µl
Positive control	red	1 x 50 µl	1 x 100 µl
Negative control	green	1 x 50 µl	1 x 100 µl
Control DNA	colourless	1 x 160 µl	2 x 240 µl

5 EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER

- DNA isolation kit (e.g. MutaCLEAN® Universal DNA/DNA, KG1038, or MutaCLEAN® Mag RNA/DNA, KG1023 / KG1024)
- PCR grade water
- Sterile microtubes
- Pipets (adjustable volume)
- Sterile pipet tips with filter
- Table centrifuge
- Vortex mixer
- Real time PCR instrument
- Optical PCR reaction tubes with lid
- Optional: Liquid handling system for automation
- Optional: BLP-DNA (bacterium-like particles, please see chapter 11 for details).

6 TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY

The MutaPLEX® MTB real time PCR-Kit is shipped on dry ice or cool packs. All components must be stored at maximum -20 °C in the dark immediately after receipt. Do not use reagents after the date of expiry printed on the package.

Up to 20 freeze and thaw cycles are possible.

For convenience, opened reagents can be stored at 2–8 °C for up to 6 months. Protect kit components from direct sunlight during the complete test run.

7 IMPORTANT NOTES

- The MutaPLEX® MTB real time PCR must be performed by qualified personnel only.
- Good Laboratory Practice (GLP) has to be applied.
- Clinical samples must always be regarded as potentially infectious material and all equipment used has to be treated as potentially contaminated.

8 GENERAL PRECAUTIONS

- Stick to the protocol described in the instructions for use.
- Set up different laboratory areas for the preparation of samples and for the set up of the PCR in order to avoid contaminations.
- Pipettes, tubes and other materials must not circulate between those different laboratory areas.
- Always use filter tips.
- Regularly decontaminate equipment and benches with ethanol-free decontaminant.
- Do not combine MutaPLEX® MTB real time PCR-Kit components of different lot numbers.

9 SAMPLE MATERIAL

Starting material for the MutaPLEX® MTB real time PCR is DNA isolated or released from clinical specimens (e.g. throat swabs, nasal swabs, bronchial lavage, sputum samples).

10 SAMPLE PREPARATION

The MutaPLEX® MTB real time PCR is suitable for the detection of MTB DNA isolated from clinical specimens with appropriate isolation methods.

Commercial kits for DNA isolation such as MutaCLEAN® Universal DNA/DNA (KG1038) or MutaCLEAN® Mag RNA/DNA (KG1023 / KG1024) are recommended.

Important: In addition to the samples, always run a water control in your extraction. Treat this water control analogous to a sample.

Comparing the amplification of the control DNA in the samples to the amplification of the internal control in the water control will give insights on possible inhibitions of the real time PCR. Furthermore, possible contaminations during DNA extraction will be detectable.

Please note chapter 11 “Control DNA”.

If the real time PCR is not performed immediately, store extracted DNA according to the instructions given by the DNA extraction kit’s manufacturer.

11 CONTROL DNA

A control DNA is supplied and can be used as extraction control or only as inhibition control. This allows the user to control the DNA isolation procedure and to check for possible real time PCR inhibition.

The bacterium-like particles (BLP-DNA) are not supplied.

DNA isolation from clinical samples

a) Control DNA or BLP-DNA used as extraction control

MutaPLEX® MTB control DNA or BLP-DNA is added to the DNA extraction.

Add 5 µl control DNA or BLP-DNA per extraction (5 µl x (N+1)). Mix well. Perform the DNA isolation according to the manufacturer’s instructions. Please follow protocol A.

The control DNA must be added to the lysis buffer of the extraction kit.

b) Control DNA used as internal control of the real time PCR

If only inhibition will be checked, please follow protocol B.

12 REAL TIME PCR

12.1 Important Points Before Starting

- Please pay attention to chapter 7 “Important Notes”.
- Before setting up the real time PCR familiarise yourself with the real time PCR instrument and read the user manual supplied with the instrument.
- The programming of the thermal profile should take place before the PCR set up.

- In every PCR run, one positive control and one negative control should be included.
- Before each use, all reagents should be thawed completely at room temperature, thoroughly mixed (do NOT vortex the reaction mix but mix by pipetting up and down repeatedly), and centrifuged very briefly.
- We recommend to keep reagents and samples at 2–8°C (e.g. on ice or a cooling block) at all times.

12.2 Procedure

If the control DNA or BLP-DNA is used to control both, the real time PCR and the DNA isolation procedure, please follow protocol A. If the control DNA is solely used to detect possible inhibition of the real time PCR, please follow protocol B.

Protocol A

The control DNA or BLP-DNA was added during DNA extraction (see chapter 11 “Control DNA”). In this case, prepare the master mix according to table 2.

The master mix contains all of the components needed for PCR except the sample. Prepare a volume of master mix for at least one sample more than required, in order to compensate for pipetting inaccuracy.

Table 2: Preparation of the master mix (control DNA was added during DNA extraction)

Volume per reaction	Volume master mix
16 µl Reaction Mix	16 µl x (N+1)

Protocol B

The control DNA is used for the control of the real time PCR only (see chapter 11 “Control DNA”). In this case, prepare the master mix according to table 3.

The master mix contains all of the components needed for real PCR except the sample. Prepare a volume of master mix for at least one sample more than required, in order to compensate for pipetting inaccuracy.

Table 3: Preparation of the master mix (control DNA is added directly to the master mix)

Volume per reaction	Volume master mix
16 µl Reaction Mix	16 µl x (N+1)
0.5 µl Control DNA *	0.5 µl x (N+1)*

*The increase in volume caused by adding the control DNA is not taken into account when preparing the PCR assay. The sensitivity of the detection system is not impaired.

Protocol A and B: real time PCR set up

- Place the number of optical PCR reaction tubes needed into the respective tray of the real time PCR instrument.
- Pipet 16 µl of the master mix into each optical PCR reaction tube.
- Add 4 µl of the eluates from the DNA isolation (including the eluate of the water control), the positive control and the negative control to the corresponding optical PCR reaction tube (table 4).
- Close the optical PCR reaction tubes immediately after filling in order to reduce the risk of contamination.

Table 4: Preparation of the real time PCR

Component	Volume
Master mix	16.0 µl
Sample	4.0 µl
Total volume	20.0 µl

12.3 Instrument settings

For the real time PCR use the thermal profile shown in table 5.

Table 5: real time PCR thermal profile

Description	Time	Temperature	No of cycles
Reverse Transcription	10 min	45 °C	1
Initial Denaturation	5 min	95 °C	1
Amplification of DNA			45
Denaturation	10 s	95 °C	
Annealing and extension	40 s Aquisition at the end of this step	60 °C	

Dependent on the real time instrument used, further instrument settings have to be adjusted according to table 6.

Table 6: Overview of the instrument settings required for the MutaPLEX® MTB real time PCR.

Real time PCR Instrument	Parameter	Detection Channel	Notes	
LightCycler 480I	MTB Control DNA	483-533 523-568	pre-installed universal color compensation FAM (510) – VIC (580)	
LightCycler 480II	MTB Control DNA	FAM (465-510) HEX (533-580)		
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	MTB Control DNA	FAM HEX	Gain 8 Gain 1	Reference dye: none
ABI 7500	MTB Control DNA	FAM JOE	Option reference dye ROX: NO	
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000	MTB Control DNA	Green Yellow	Gain 5 Gain 5	

13 DATA ANALYSIS

The MTB-specific amplification is measured in the FAM channel. The amplification of the control DNA is measured in the VIC®/HEX/JOE/TET channel.

The following results can occur:

- **A signal in the FAM channel is detected:**

The result is positive, the sample contains MTB DNA.

In this case, detection of a signal of the control DNA in the VIC®/HEX/JOE/TET channel is inessential, as high concentrations of MTB DNA may reduce or completely inhibit amplification of the control DNA .

- **No signal in the FAM channel, but a signal in the VIC®/HEX/JOE/TET channel is detected:**

The result is negative, the sample does not contain MTB DNA.

The signal of the control DNA excludes the possibilities of DNA isolation failure (in case the control DNA is being used as an extraction control) and/or real time PCR inhibition. If the C_T value of a sample differs significantly from the

CT value of the water control, a partial inhibition occurred, which can lead to negative results in weak positive samples (see „Troubleshooting“).

- **Neither in the FAM nor in the VIC®/HEX/JOE/TET channel a signal is detected:**

A diagnostic statement cannot be made.

The DNA isolation was not successful or an inhibition of the PCR has occurred. In case the control DNA was added during DNA isolation and not directly to the PCR master mix, the negative control is negative in both channels.

Figure 1 and figure 2 show examples for positive and negative real time PCR results.

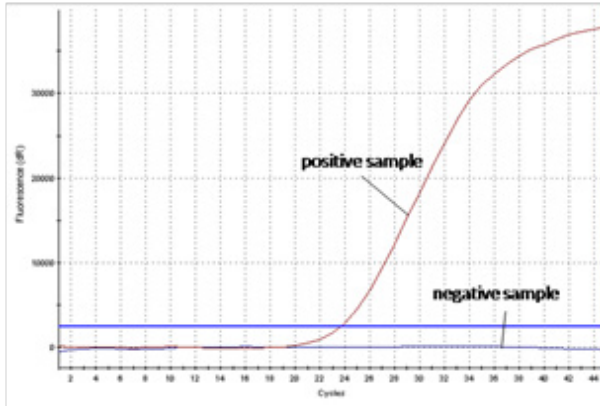


Figure 1: The positive sample shows MTB-specific amplification in the FAM channel, whereas no fluorescence signal is detected in the negative sample.

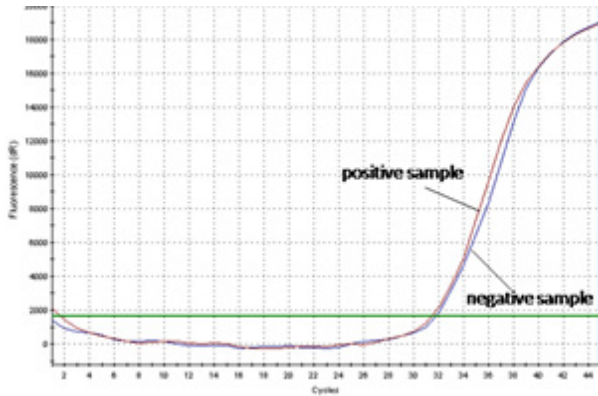


Figure 2: The positive sample as well as the negative sample show a signal in the control DNA-specific VIC®/HEX/JOE/TET channel. The amplification signal of the control DNA in the negative sample shows that the missing signal in the MTB-specific FAM channel is not due to PCR inhibition or failure of DNA isolation, but that the sample is a true negative.

14 ASSAY VALIDATION

Set a threshold as follows:

Negative controls

All negative controls should be below the threshold. If there is a potential contamination (appearance of a curve in the negative control or a cluster of curves in specimens at high C_T – for example above 36), results obtained are not interpretable and the whole run (including extraction) has to be repeated.

Positive controls

All the positive controls must show a positive (i. e. exponential) amplification curve. The positive controls must fall below a C_T of 30.

Internal controls

All internal controls must show a positive (i. e. exponential) amplification curve. The internal control must fall below a C_T of 33. If the internal control is above C_T 34, this points to a purification problem or a strong positive sample that can inhibit the IC. In the latter case, the assay is valid. If a water control run is performed, the IC must fall below a C_T of 33.

15 LIMITATIONS OF THE METHOD

The results must always be considered in relation to the clinical symptoms. Therapeutical consequences should be made in consideration of clinical data.

A negative test result does not exclude a MTB infection.

16 TROUBLESHOOTING

The following troubleshooting guide is included to help you with possible problems that may arise when performing a real time PCR.

No fluorescence signal in the FAM channel of the positive control

The selected channel for analysis does not comply with the protocol

Select the FAM channel for analysis of the virus-specific amplification and the VIC®/HEX/JOE/TET channel for the amplification of the control DNA .

Incorrect configuration of the real time PCR

Check your work steps and compare with chapter "Procedure".

The programming of the thermal profile is incorrect

Compare the thermal profile with the protocol (table 5).

Incorrect storage conditions for one or more kit components or kit expired

Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary, use a new kit and make sure kit components are stored as described in chapter "Transport, Storage and Stability".

Weak or no signal of the control DNA and simultaneous absence of a signal in the virus-specific FAM channel

real time PCR conditions do not comply with the protocol

Check the real time PCR conditions (chapter 12).

real time PCR inhibited

Make sure that you use an appropriate isolation method (see "Sample preparation") and follow the manufacturer's instructions. Make sure that the ethanol-containing washing buffer of the isolation kit has been completely removed. An additional centrifugation step at high speed is recommended before elution of the DNA.

DNA loss during isolation process

In case the control DNA was added before extraction, the lack of an amplification signal can indicate that the DNA isolation was not successful. Make sure that you use an appropriate isolation method (commercial kits are recommended) and stick to the manufacturer's protocol.

Incorrect storage conditions for one or more components or kit expired

Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary, use a new kit and make sure kit components are stored as described in chapter "Transport, Storage and Stability".

Detection of a fluorescence signal in the FAM channel of the negative control***Contamination during preparation of the PCR***

Repeat the real time PCR in replicates. If the result is negative in the repetition, the contamination occurred when the samples were pipetted into the optical PCR reaction tubes. Make sure to pipet the positive control last and close the optical PCR reaction tube immediately after adding the sample. If the same result occurs, one or more of the kit components might be contaminated. Make sure that work space and instruments are decontaminated regularly. Use a new kit and repeat the real time PCR.

17 KIT PERFORMANCE***17.1 Diagnostic Sensitivity and Specificity***

During the validation study of the MutaPLEX® MTB real time PCR kit, 11 positive and 13 negative samples were tested. The diagnostic sensitivity was found to be 100% and the diagnostic specificity 100% (table 7).

The positive predictive value was found to be 100%, the negative predictive value showed to be 100%.

Table 7: Overview of the amount of samples tested and the resulting positive and negative predictive values

	positive samples	negative samples
MutaPLEX® MTB positive	11	0
MutaPLEX® MTB negative	0	13
Sensitivity	100%	
Specificity	100%	

During the validation study of the MutaPLEX® MTB real time PCR ring trial samples were tested. The table below shows the outcome of the ring trial.

Table 8: Results of MTB ring trial.

Sample	Sample Content	Expected Result	Result	Sample Type
MTBDNA14-01	<i>M. tuberculosis</i> complex	positive	positive	core
MTBDNA14-02	Mycobacterium negative	negative	negative	core
MTBDNA14-03	<i>M. tuberculosis</i> complex	positive	positive	core
MTBDNA14-04	<i>M. tuberculosis</i> complex	positive	positive	educational
MTBDNA14-05	<i>M. xenopi</i>	negative	negative	educational
MTBDNA14-06	<i>M. tuberculosis</i> complex	positive	positive	core
MTBDNA14-07	<i>M. tuberculosis</i> complex	positive	positive	educational
MTBDNA14-08	<i>M. tuberculosis</i> complex	positive	positive	core
MTBDNA14-09	Mycobacterium negative	negative	negative	core
MTBDNA14-10	<i>M. tuberculosis</i> complex	positive	positive	core

17.2 Analytical Sensitivity

The limit of detection (LoD) of MutaPLEX® MTB real time PCR was determined using serial dilutions of synthetic target DNA-sequences in a Stratagene Mx3000 real time PCR instrument. The LoD of MutaPLEX® MTB real time PCR for MTB is ≤ 1 target copy per reaction each.

17.3 Analytical Specificity








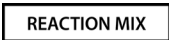






The specificity of the MutaPLEX® MTB real time PCR was evaluated additionally with different other relevant viruses and bacteria found in clinical samples.

The MutaPLEX® MTB real time PCR showed a positive result for the sample containing MTB, whereas samples containing other pathogens were reliably tested negative. The results are shown in table 9.

Table 9: Bacterial and viral pathogens tested for the determination of the analytical sensitivity of the MutaPLEX® MTB real time PCR Kit.

Species	Serogroup	Result
Influenza virus A A/ Brisbane H1N1 59/2007 E40/08	negative	negative
Influenza virus A Indonesia H5N1 05/2005	negative	negative
Influenza virus A New Caledonia 20/99 H1N1	negative	negative
Influenza virus A Panama H3N2 2007/99	negative	negative
Influenza virus B B/ Brisbane 60/2008 E09/09	negative	negative
Influenza virus B Jiangsu 10/2003	negative	negative
RSV strain A2 ATCC-VR-1540	negative	negative
RSV strain B WV/14617/85 ATCC-VR-1400	negative	negative
Parainfluenza virus type 3 Str. C243 VR93	negative	negative
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ATCC 15531	negative	negative
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i> strain CM-1, ATCC-VR-1360	negative	negative
Adenovirus	negative	negative
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 2	negative	negative
Rhinovirus type 3 FEBVR483	negative	negative
<i>Streptococcus agalactiae</i>	negative	negative
Coxsackievirus B5	negative	negative
MRSA	negative	negative
<i>M. tuberculosis complex</i>	positive	positive

18 ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

DNA	Deoxyribonucleid Acid	BLP	Bacterium-Like Particles
C_T	Cycle threshold		Control DNA
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		To be used with
PCR	Polymerase Chain Reaction		Catalog number
	Negative control		Contains sufficient for <n> test
	Positive control		Upper limit of temperature
	Reaction Mix		Manufacturer
	Content		Use by
	Consult instructions for use		Lot number
			In vitro diagnostic medical device

19. LITERATURE

- Centers for Disease Control and Prevention (2016), Division of Tuberculosis Elimination (DTBE). <https://www.cdc.gov/tb/default.htm>

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

