

GenoType[®] MTBDR*plus*

VER 1.0



Deutsch: S. 2-22

English: p. 23-42

Français : p. 43-62

Italiano: p. 63-82

Español: p. 83-102

Português: p. 103-122

Česky: s. 123-142

05/2008



GenoType® MTBDRplus **Molekulargenetisches Testsystem zur Identifizierung** **der Rifampicin und/oder Isoniazid-Resistenz des** ***Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes**

Methodik

Der **GenoType® MTBDRplus**-Test beruht auf der **DNA•STRIP®**-Technologie und erlaubt die molekulargenetische Identifizierung des *M. tuberculosis*-Komplexes und dessen Resistenz gegen Rifampicin und/oder Isoniazid aus Kulturproben oder pulmonalem mikroskopisch-positivem Direktmaterial. Der Nachweis einer Rifampicin-Resistenz wird durch den Nachweis der wichtigsten Mutationen des *rpoB*-Gens (kodiert für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase) geführt. Zur Identifizierung einer „high level“-Isoniazid-Resistenz wird das *katG*-Gen (kodiert für die Katalase- Peroxidase) und zur Identifizierung einer „low level“-Isoniazid-Resistenz die Promotorregion des *inhA*-Gens (kodiert für die NADH-Enoyl-ACP-Reduktase) untersucht.

Der gesamte Testablauf unterteilt sich in folgende drei Phasen: DNA-Isolierung aus Kulturproben (Festmedium/Flüssigkultur) oder Direktmaterial (pulmonal, mikroskopisch-positiv, dekontaminiert) – die hierzu benötigten Reagenzien sind nicht Bestandteil des Kits, Multiplex-Amplifikation mit Biotin-markierten Primern (eine hierzu benötigte thermostabile DNA-Polymerase ist nicht Bestandteil des Kits) und reverse Hybridisierung.

Die Hybridisierung gliedert sich in folgende Arbeitsschritte: chemische Denaturierung der Amplifikationsprodukte, Hybridisierung der Biotin-markierten, einzelsträngigen Amplifikate an membrangebundene Sonden, Entfernen aller unspezifisch gebundenen Amplifikate, Zugabe eines Streptavidin/Alkalische Phosphatase (AP)-Komplexes und AP-vermittelte Farbreaktion. Das Bandenmuster wird mit Hilfe einer Schablone visuell ausgewertet.

Lagerung und Vorsichtsmaßnahmen

Primer/Nukleotid-Mix (PNM) streng getrennt von DNA-haltigen Produkten lagern. Zur kurzzeitigen Lagerung bis zu 4 Wochen bei 2-8°C, zur langfristigen Lagerung bei -20°C aufbewahren. Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden; gegebenenfalls den PNM aliquotieren. Alle weiteren Kitbestandteile bei

2-8°C lagern. Das angegebene Haltbarkeitsdatum sollte nicht überschritten werden.

Untersuchungsmaterial von Patienten und daraus angelegte Kulturen, wie sie für Laboratoriumsuntersuchungen eingesetzt werden, sind als potenziell infektiös einzustufen und entsprechend zu behandeln. Proben von Risikopatienten sowie daraus angelegte Kulturen sollten immer gekennzeichnet und unter geeigneten Sicherheitsvorkehrungen bearbeitet werden. Darüber hinaus sind die jeweils geltenden Vorschriften zur Unfallverhütung, zum Umweltschutz und zum Umgang mit Gefahrstoffen einzuhalten. Insbesondere müssen stets geeignete Schutzkleidung und Schutzhandschuhe getragen werden. Die Probenhandhabung und die Aufbereitungsschritte bis einschließlich des Hitzeinaktivierungsschritts sind in einer biologischen Sicherheitswerkbank der Klasse II durchzuführen. Vor dem Hitzeinaktivierungsschritt dürfen Proben nur unter Verwendung eines Aerosolschutzrotors zentrifugiert werden. Den Aerosolschutzrotor ausschließlich in der Sicherheitswerkbank öffnen. Nach der Hitzeinaktivierung kann ein Standardrotor für das Zentrifugieren von Proben außerhalb der Sicherheitswerkbank verwendet werden.

Bei der Durchführung des Tests sind die für die Nukleinsäureamplifikation notwendigen Vorsichtsmaßnahmen zu beachten. Utensilien wie Pipettenspitzen, die mit den Reagenzien in Berührung kommen, müssen frei von DNasen sein.

Beim Umgang mit den Kitreagenzien sind folgende besondere Sicherheitsmaßnahmen zu beachten:

Das **Denaturierungsreagenz** (DEN) enthält <2% (w/w) NaOH und wirkt reizend.

Es gelten R 36/38 sowie S 26-37/39-45.

Das **Substrat-Konzentrat** (SUB-C) enthält Dimethylsulfoxid und wirkt reizend.

Es gelten R 36/37/38 und S 23-26-36.

Weitere Informationen können den Sicherheitsdatenblättern entnommen werden, die abrufbar sind unter: www.hain-lifescience.de/produkte/sicherheitsdaten.html

Qualitätssicherung

Zur Validierung der korrekten Testdurchführung und der Funktionalität der Lösungen trägt jeder Membranstreifen 5 Kontrollzonen:

- eine Konjugatkontrollzone, die eine erfolgreiche Konjugatbindung und Substratreaktion anzeigt

- eine Amplifikationskontrollzone, die eine erfolgreiche Amplifikationsreaktion anzeigt
- drei Locuskontrollzonen (*rpoB*, *katG* und *inhA*), die die optimale Sensitivität der Reaktion für jeden getesteten Gen-Locus kontrollieren

DNA-Isolierung

Als Ausgangsmaterial für den Test können auf Festmedium (z. B. Loewenstein-Jensen, Middlebrook) oder in Flüssigkultur (z. B. BACTEC, MB-Check) angezogene Mykobakterien sowie mikroskopisch-positives Direktmaterial (pulmonale Proben) eingesetzt werden. Der Test eignet sich nicht zum Nachweis von Mykobakterien aus mikroskopisch-negativem Direktmaterial. Der Arbeitsraum muss völlig frei von amplifizierter DNA sein. Zur Inaktivierung des Probenmaterials muss dieses im Verlauf der DNA-Isolierung mindestens 20 min bei 95°C erhitzt werden.

Zur DNA-Isolierung eignen sich alle Methoden, mit denen amplifizierbare DNA aus Bakterien gewonnen werden kann. Folgende Schnellmethode liefert in der Regel ebenfalls gut amplifizierbare DNA:

- 1a. Bei Verwendung von Koloniematerial mit einer Impföse Bakterien abnehmen und in ca. 300 µl Wasser (*molecular biology grade*) suspendieren.
 - 1b. Bei Verwendung von Flüssigkulturen 1 ml Bakterienkultur, bei Verwendung von Direktmaterial 500 µl einer dekontaminierten* Probe durch fünfzehnminütige Zentrifugation bei ca. 10000 x g in einer Standard-Tischzentrifuge mit Aerosol-schutzrotor in einer Sicherheitswerkbank der Klasse II pelletieren. Überstand werfen und Bakterien unter Vortexen in 100-300 µl Wasser (Kulturproben) bzw. 100 µl Wasser (Direktproben) resuspendieren.
 2. Bakteriensuspension aus 1a oder 1b 20 min bei 95°C im Wasserbad inkubieren.
 3. Probe 15 min in einem Ultraschallbad beschallen.
 4. Probe 5 min bei höchster Drehzahl abzentrifugieren und 5 µl des Überstandes zur PCR einsetzen. Soll die DNA-Lösung über einen längeren Zeitraum gelagert werden, den Überstand in ein neues Gefäß überführen.
- * Die Proben sind unter Anwendung der NALC-NaOH-Methode gemäß den Empfehlungen der CDC-Veröffentlichung „Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory“ aufzubereiten.

Detaillierte DNA-Isolierungsprotokolle sind auf Anfrage bei der Fa. Hain Lifescience oder im Internet unter www.hain-lifescience.de/pdf/dnaisol_myco.pdf erhältlich.

Der vorliegende Assay wurde auch mit dem **GenoLyse®**-Kit (s. Kapitel Bestellinformationen) validiert, der alternativ zu der oben beschriebenen Methode zur DNA-Isolierung aus Direktproben eingesetzt werden kann. Die Handhabung ist in der Anleitung des **GenoLyse®**-Kits beschrieben.

Amplifikation

Den Amplifikations-Mix (45 µl) in einem Raum herstellen, der garantiert frei von DNA ist. Aus Gründen des Kontaminationsschutzes sollte die zu amplifizierende DNA in einem abgetrennten Bereich zugegeben werden.

Pro Ansatz werden benötigt:

- 35 µl PNM
- 5 µl 10-fach Polymerase-Puffer – nicht im Kit enthalten
- x µl MgCl_2 -Lösung¹⁾ – nicht im Kit enthalten
- 1-2 Unit(s) thermostabile DNA-Polymerase (Angaben des Herstellers beachten)
 - nicht im Kit enthalten
- y µl Wasser zum Auffüllen auf 45 µl (ohne Berücksichtigung des Enzymvolumens)
 - nicht im Kit enthalten
- 5 µl DNA-Lösung (20-100 ng DNA) zugeben. Dies ergibt ein Endvolumen von 50 µl (ohne Berücksichtigung des Enzymvolumens).

¹⁾ Je nach eingesetztem Enzym/Puffersystem liegt die optimale MgCl_2 -Endkonzentration zwischen 1,5 und 2,5 mM. Beachten Sie, dass manche 10-fach Polymerase-Puffer bereits MgCl_2 enthalten.

Berechnen Sie die Anzahl der zu amplifizierenden Proben. Diese ergibt sich aus der Zahl der zu untersuchenden Proben zuzüglich der Zahl der gewünschten Kontrollproben. Einer Kontaminationskontrolle z. B. wird statt DNA-Lösung Wasser zugesetzt. Erstellen Sie einen Master-Mix, der bis auf die DNA-Lösungen sämtliche zur Amplifikation benötigten Reagenzien enthält, und mischen Sie gut (nicht vortexen). Aliquotieren Sie den Mix zu je 45 µl in vorbereitete PCR-Reaktionsgefäße.

Programmierungsprotokoll für Thermocycler:

	Kulturproben	Direktmaterial
5 min ²⁾ 95°C	1 Zyklus	1 Zyklus
30 sec 95°C 2 min 58°C	10 Zyklen	10 Zyklen
25 sec 95°C 40 sec 53°C 40 sec 70°C	20 Zyklen	30 Zyklen
8 min 70°C	1 Zyklus	1 Zyklus

²⁾ Bei einigen „Hot Start“ DNA-Polymerasen muss dieser Schritt verlängert werden (Herstellerangaben beachten).

Amplifikationsprodukte können bei +4 bis –20°C gelagert werden.

Zur Überprüfung der Amplifikationsreaktion können 5 µl des betreffenden Amplifikates direkt ohne Zugabe von Ladepuffer auf ein zweiprozentiges Agarosegel aufgetragen werden. Die Amplifikationsprodukte haben eine Länge von ca. 63 bp (Amplifikationskontrolle), 115 bp (*M. tuberculosis*-Komplex), 166 bp (*rpoB*), 120 bp (*katG*) bzw. 110 bp (*inhA*).

Hybridisierung

Vorbereitung

Schüttelwasserbad/**TwinCubator®** auf **45°C** vorwärmen; die maximal zulässige Abweichung von der Solltemperatur beträgt $\pm 1^\circ\text{C}$. Lösungen HYB und STR vor Gebrauch auf $37\text{--}45^\circ\text{C}$ erwärmen.

Auf Präzipitatisfreiheit achten und gegebenenfalls vorsichtig schütteln. Alle anderen Reagenzien (außer CON-C und SUB-C) auf Raumtemperatur temperieren. Lösung CON-D weist eine leichte Trübung auf. Konjugat-Konzentrat (CON-C, orange) und Substrat-Konzentrat (SUB-C, gelb) werden in geeigneten Gefäßen in der benötigten Menge im Verhältnis 1:100 mit dem zugehörigen Puffer verdünnt (**CON-C mit CON-D, SUB-C mit SUB-D**), gut gemischt und auf Raumtemperatur temperiert. Pro Membranstreifen werden je 10 µl Konzentrat mit je 1 ml des entsprechenden Puffers verdünnt. CON-C stets vor Gebrauch frisch verdünnen. Verdünntes SUB-C ist lichtgeschützt und bei Raumtemperatur mindestens 4 Wochen stabil.

1. **Für jede zu untersuchende Probe in die untere Ecke einer Wannenkavität 20 µl Denaturierungsreagenz (DEN, blau) pipettieren.**
2. **Je 20 µl Amplifikat zugeben, durch Auf- und Abpipettieren gut mischen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.**

Währenddessen Membranstreifen (STRIPS) mit einer Pinzette aus dem Röhrchen nehmen und mit einem Bleistift unter der Farbmarkierung beschriften. Membranstreifen nur mit Handschuhen berühren.

3. **Jeweils 1 ml vorgewärmten und gemischten Hybridisierungspuffer (HYB, grün) zugeben. Die Wanne auf einer Unterlage so lange vorsichtig schwenken, bis die Lösung eine homogene Färbung aufweist.**

Darauf achten, dass keine Lösung in benachbarte Kavitäten gelangt.

4. **In jede benutzte Kavität einen Membranstreifen legen.**

Die Membranstreifen müssen dabei vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sein und die beschichtete Seite (kenntlich durch die Farbmarkierung) muss nach oben weisen. Membranstreifen, die sich wenden, mit einer Pinzette zurückdrehen. Zur Vermeidung von Kontaminationen die Pinzette nach jeder Benutzung reinigen. Dies gilt auch für alle nachfolgenden Inkubations- und Waschschrte.

5. **Wanne für 30 Minuten bei 45°C im Schüttelwasserbad/TwinCubator® inkubieren.** Schüttelfrequenz des Wasserbads so wählen, dass eine stetige Durchmischung der Flüssigkeit erreicht wird, aber eine Kontamination benachbarter Kavitäten

durch Spritzen vermieden wird. Um eine gute Wärmeübertragung sicherzustellen, muss die Wanne mindestens zu einem Drittel in Wasser eingetaucht sein.

6. **Hybridisierungspuffer vollständig entfernen.**

Hierzu z.B. eine mit einer Vakuumpumpe verbundene Pasteurpipette verwenden.

7. **Jeweils 1 ml vorgewärmte Stringent-Waschlösung (STR, rot) zugeben und Wanne 15 Minuten bei 45°C im Wasserbad/TwinCubator® unter leichtem Schütteln inkubieren.**

8. **Von diesem Schritt an bei Raumtemperatur arbeiten. Stringent-Waschlösung vollständig entfernen.**

Anschließend Flüssigkeitsreste durch Abklopfen der Wanne auf einer saugfähigen Unterlage entfernen. Dies gilt auch für alle anderen Waschschrte.

9. **Membranstreifen einmal 1 Minute mit 1 ml Rinse-Lösung (RIN) unter stetiger Bewegung auf Horizontalschüttler/TwinCubator® waschen (RIN nach Inkubation abschütten).**

10. **1 ml verdünntes Konjugat (s.o.) zu jedem Membranstreifen geben und 30 Minuten auf Horizontalschüttler/TwinCubator® inkubieren.**

11. **Lösung abschütten und jeden Membranstreifen zweimal je 1 Minute mit 1 ml Rinse-Lösung (RIN) und einmal mit ca. 1 ml destilliertem Wasser (z. B. Spritzflasche verwenden) auf Horizontalschüttler/TwinCubator® waschen (Lösung jeweils abschütten).**

Nach dem letzten Waschschrte Wasser möglichst vollständig entfernen.

12. **Je 1 ml verdünntes Substrat (s.o.) zu jedem Membranstreifen geben und lichtgeschützt ohne Schütteln inkubieren.**

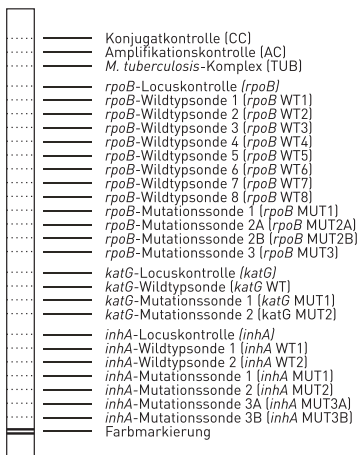
In Abhängigkeit von den Testbedingungen (z. B. der Raumtemperatur) kann die Substratinkubationszeit zwischen 3 und 20 Minuten variieren. Eine zu lang andauernde Substratinkubation führt zu einer Verstärkung der Hintergrundfärbung und kann die Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen.

13. **Substratreaktion durch zweimaliges kurzes Waschen mit destilliertem Wasser stoppen.**

14. **Membranstreifen mit einer Pinzette aus den Kavitäten nehmen und zum Trocknen auf saugfähiges Papier legen.**

Auswertung und Interpretation der Ergebnisse

Die Membranstreifen nach dem Trocknen auf eine geeignete Unterlage kleben und lichtgeschützt aufbewahren. Ein Auswertungsbogen liegt dem Kit bei und ist unter www.hain-lifescience.de/pdf/mtbdrplus_evaluation.pdf verfügbar. Wenn dieser Auswertungsbogen verwendet wird, die entwickelten Membranstreifen in die dafür vorgesehenen Felder kleben; dabei die Banden CC und AC an den entsprechenden Hilfslinien ausrichten. Die Resistenz bestimmen und in der entsprechenden Spalte vermerken; als Interpretationshilfe sind im nachfolgenden Kapitel einige Auswertungsbeispiele aufgeführt. Als Auswertehilfe liegt dem Kit außerdem eine Schablone bei, die ebenfalls an den Banden CC und AC des Membranstreifens ausgerichtet werden muss. Insgesamt sind auf dem Membranstreifen 27 Reaktionszonen vorhanden (s. Abbildung).



Hinweis: Der Membranstreifen entspricht nicht der Originalgröße und darf nicht zur Auswertung herangezogen werden.

Nicht alle Banden eines Membranstreifens müssen die gleiche Signalstärke aufweisen.

Konjugatkontrolle (CC)

Diese Reaktionszone dokumentiert die Effizienz von Konjugatbindung und Substratreaktion und muss immer entwickelt sein.

Amplifikationskontrolle (AC)

Das bei korrekter Durchführung während der Amplifikation entstehende Kontrollprodukt bindet an die Amplifikationskontrollzone. Ist die Bande entwickelt, kann das Vorhandensein von Hemmstoffen sowie Fehler bei Ansatz und Durchführung der Amplifikationsreaktion ausgeschlossen werden.

Bei einem positiven Testergebnis kann das Signal der Amplifikationskontrollbande aufgrund von Kompetitionsreaktionen während der Amplifikation abgeschwächt sein und im Extremfall sogar ganz verschwinden. Der Test ist in diesem Falle jedoch ordnungsgemäß durchgeführt worden und eine Wiederholung nicht erforderlich.

Eine schwache oder fehlende Amplifikationskontrolle bei einem negativen Testergebnis ist ein Hinweis auf Fehler bei Ansatz und/oder Durchführung der Amplifikationsreaktion oder das Vorhandensein von Hemmstoffen. Die Probe ist dann als nicht valide zu werten und muss wiederholt werden.

***M. tuberculosis*-Komplex (TUB)**

Diese Reaktionszone hybridisiert, soweit bekannt, mit Amplifikaten aller Mitglieder des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes. Ist diese Reaktionszone negativ, handelt es sich bei dem Keim nicht um ein Mitglied des *M. tuberculosis*-Komplexes und kann somit mit dem vorliegenden Testsystem nicht ausgewertet werden.

Locuskontrollen (*rpoB*, *katG*, *inhA*)

Die Locuskontrollzonen erfassen einen für den jeweiligen Locus spezifischen Genbereich und müssen daher immer ein positives Signal zeigen.

Wildtypsonden

Die Wildtypsonden umfassen die wichtigsten Resistenzbereiche des jeweiligen Gens (s. Abb. 1, Tab. 1, 2 und 3). Wenn alle Wildtypsonden eines Gens ein positives Signal ergeben zeigt dies, dass innerhalb der untersuchten Bereiche keine detektierbare Mutation in der Nukleinsäuresequenz vorliegt. Der Stamm ist dann sensitiv für das entsprechende Antibiotikum.

Ist in einem der mit den Wildtypsonden abgedeckten Bereiche eine Nukleinsäure mutiert, kann das entsprechende Amplifikat nicht an die dazugehörige Wildtypsonde binden. Der Wegfall mindestens einer der Wildtypsonden deutet somit auf eine Resistenz des getesteten *M. tuberculosis*-Stamms gegen das entsprechende Antibiotikum hin.

Eine Bande wird nur positiv gewertet, wenn ihre Intensität etwa gleich stark oder stärker als die der Amplifikationskontrolle (AC) ist.

Jedes Bandenmuster, das von dem Wildtyp-Bandenmuster abweicht, liefert einen Hinweis auf eine Resistenz des untersuchten Stamms. Das *rpoB*-Bandenmuster erlaubt eine Aussage über eine Rifampicin-Resistenz des entsprechenden Stamms, das *katG*-Bandenmuster über eine „high-level“- , das *inhA*-Bandenmuster über eine „low-level“-Isoniazid-Resistenz.

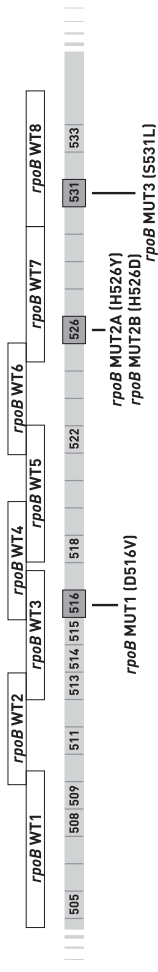


Abbildung 1: Rifampicin-Resistenzregion des *rpoB*-Gens

rpoB WT1-8 *rpoB*-Wildtypsonden; *rpoB* MUT1-3: *rpoB*-Mutationssonden. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen (Codons) an, in denen die in der Tabelle aufgeführten Mutationen vorliegen. Die Codons, für die Mutations-Sonden entwickelt wurden, sind jeweils hervorgehoben.

Mutationssonden

Die verschiedenen Mutationssonden detektieren einige häufig vorkommende Mutationen (s. Tab. 1, 2 und 3). Die positiven Signale der Mutationssonden *rpoB* MUT2A und MUT2B können geringere Intensitäten als die der anderen Sonden aufweisen. Eine Bande wird nur positiv gewertet, wenn ihre Intensität etwa gleich stark oder stärker als die der Amplifikationskontrolle (AC) ist.

Jedes Bandenmuster, das von dem Wildtyp-Bandenmuster abweicht, liefert einen Hinweis auf eine Resistenz des untersuchten Stamms. Das *rpoB*-Bandenmuster erlaubt eine Aussage über eine Rifampicin-Resistenz des entsprechenden Stamms, das *katG*-Bandenmuster über eine „high-level“- , das *inhA*-Bandenmuster über eine „low-level“-Isoniazid-Resistenz.

Folgende Sonderfälle sind zu beachten:

1. Es besteht die Möglichkeit, dass die getestete Probe einen heterogenen Stamm enthält. Hat dieser zum Zeitpunkt der Untersuchung nur zu einem Teil eine Resistenz ausgebildet, kann sowohl eine der Mutationsbanden wie auch die zugehörige Wildtypbande entwickelt sein.
2. Es besteht die Möglichkeit, dass die getestete Probe mehr als einen *M. tuberculosis*-Stamm (durch Mischkultur oder Kontamination) enthält. Weist von diesen mindestens einer eine Mutation auf, kann sowohl eine der Mutationsbanden als auch die zugehörige Wildtyp-Bande entwickelt sein.

Tabelle 1: Mutationen im *rpoB*-Gen und die korrespondierenden Wildtyp- und Mutationssonden (Erweitert nach Telenti et al. 1993, Lancet, 341: 647-650)

wegfallende Wildtypsonde(n)	erfasste Codons	erscheinende Mutationssonde	Mutation
<i>rpoB</i> WT1	505-509		F505L T508A S509T
<i>rpoB</i> WT2	510-513		L511P*
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517		Q513L* Q513P del514-516
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<i>rpoB</i> MUT1	D516V D516Y del515
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522		del518* N518I
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>rpoB</i> WT7	526-529	<i>rpoB</i> MUT2A <i>rpoB</i> MUT2B	H526Y H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L
			H526S H526C
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<i>rpoB</i> MUT3	S531L S531P S531Q* S531W L533P

* Diese sehr seltene Mutation wurde bisher nur theoretisch (*in silico*) nachgewiesen. Es besteht daher die Möglichkeit, dass einige Mutationen *in vitro* nicht nachweisbar sind.

Tabelle 2: Mutationen im *katG*-Gen und die korrespondierenden Wildtyp- und Mutationssonden

wegfallende Wildtypsonde(n)	erfasste Codons	erscheinende Mutationssonde	Mutation
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1	S315T1
		<i>katG</i> MUT2	S315T2

Tabelle 3: Mutationen im *inhA*-Promotorbereich und die korrespondierenden Wildtyp- und Mutationssonden

wegfallende Wildtypsonde(n)	erfasste Nukleinsäureposition	erscheinende Mutationssonde	Mutation
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T8A

Auswertungsbeispiele

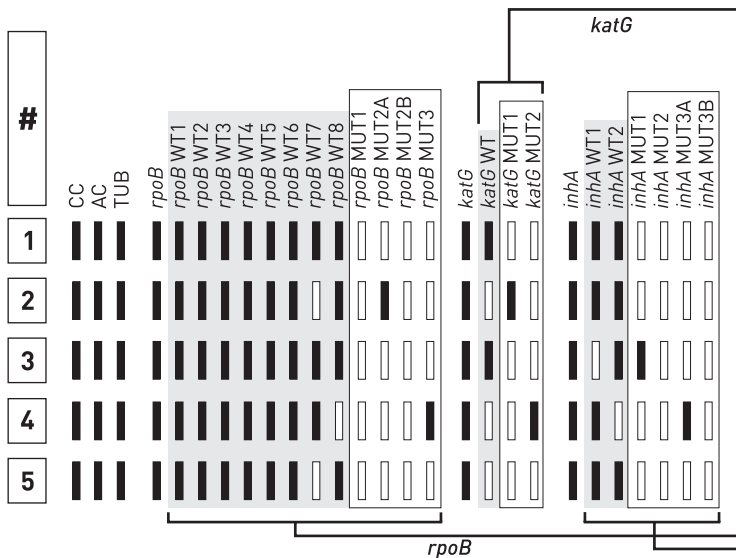


Abbildung 2: Mögliche Bandenmuster und deren Auswertung in Bezug auf eine Rifampicin- und/oder Isoniazid-Resistenz

Zeigen alle Wildtypbanden eines Gens eine Anfärbung, wird dies als positiv gewertet und mit „+“ in die WT-Spalte des entsprechenden Gens eingetragen. Fällt mindestens eine der Wildtypbanden weg, wird dies als negativ gewertet und entsprechend mit „-“ in der WT-Spalte vermerkt. Zeigt keine der Mutationsbanden eine Anfärbung, wird dies als negativ gewertet und mit „-“ in der MUT-Spalte des entsprechenden Gens eingetragen. Zeigt mindestens eine der Mutationsbanden ein Signal, wird dies als positiv verzeichnet.

TUB		<i>rpoB</i> WT		<i>rpoB</i> MUT		<i>katG</i> WT		<i>katG</i> MUT		<i>inhA</i> WT		<i>inhA</i> MUT		RMP		INH	
		sensitive	resistant			sensitive	resistant			sensitive	resistant			sensitive	resistant		
+	+			-		+		-		+		-		+		+	
+	-			+		-		+		+		-			+		+
+	+			-		+		-		-		+		+			+
+	-			+		-		+		-		+			+		+
+	-			-		-		-		+		-			+		+

inhA

Beispiel 1 zeigt das Wildtyp-Bandenmuster. Da alle Wildtypbanden, aber keine der Mutationsbanden entwickelt sind, ist in der Auswertetabelle für alle drei Gene ein „+“ für WT und ein „-“ für MUT eingetragen. Entsprechend sind die Kästchen für Rifampicin (RMP)- und Isoniazid (INH)-sensitiv markiert.

In Beispiel 5 fehlt eine der *rpoB*-Wildtypbanden und die *katG*-Wildtypbande, daher ist ein „-“ bei *rpoB* WT und bei *katG* WT verzeichnet. Keine der Mutationsbanden ist entwickelt, daher steht auch in diesen Spalten ein „-“. Der *inhA* Promotorbereich entspricht dem Wildtyp-Bandenmuster. Der Stamm ist als RMP- und INH-resistent ausgewertet. Da die INH-Resistenz auf das *katG*-Gen zurückzuführen ist, handelt es sich um eine „high level“-Isoniazid-Resistenz.

Grenzen der Methode

Die in dieser Anleitung getroffenen Aussagen zum Leistungsvermögen der Methode beziehen sich auf Kulturproben bzw. pulmonales, mikroskopisch-positives Direktmaterial. Für eine Aussage über die Eignung von anderem mikroskopisch positivem Direktmaterial ist die Datenlage nicht ausreichend.

Wie bei jedem Nachweissystem auf DNA-Basis wird in diesem Test nur die Nukleinsäuresequenz, nicht aber die Aminosäuresequenz überprüft. Daher können Mutationen, die nicht zu einem Aminosäureaustausch führen („Stille Mutation“), trotzdem zu einem Wegfall einer der Wildtyp-Sonden führen.

Neueste Daten weisen darauf hin, dass trotz einer vorliegenden L533P-Mutation der betreffende *M. tuberculosis*-Stamm RMP-sensitiv sein kann. Bleibt die WT8-Sonde aus und ist gleichzeitig die *rpoB* MUT3-Sonde nicht entwickelt, sollte daher das Ergebnis der phänotypischen Resistenzbestimmung mit einbezogen werden.

In neueren Publikationen wurden weitere Rifampicin-Resistenz-vermittelnde Mutationen innerhalb des hier betrachteten *rpoB*-Genbereichs veröffentlicht. Diese konnten aufgrund ihres sehr seltenen Vorkommens mit dem vorliegenden Testsystem nicht validiert, sondern nur *in silico* nachgewiesen werden. Ein *in silico*-Nachweis schließt jedoch die theoretische Möglichkeit, dass einige dieser Mutationen *in vitro* nicht detektierbar sind, nicht aus.

Mit dem **GenoType® MTBDRplus**-Test werden ausschließlich die Resistenzen des *M. tuberculosis*-Komplexes detektiert, die auf Mutationen in den hier untersuchten *rpoB*-, *katG*- und *inhA*-Regionen zurückzuführen sind. Resistenzen, die auf Mutationen anderer Gene oder Genbereiche zurückzuführen sind, sowie andere Rifampicin- und Isoniazid-Resistenzmechanismen werden mit diesem Test nicht nachgewiesen.

Die Kenntnis des Anwenders über das regionale Verteilungsmuster auftretender Mutationen in den vom Test untersuchten Genen wird vorausgesetzt. Liegt keine Einschätzung der Mutationsverteilung vor, sollte dies vor dem Einsatz des Tests abgeklärt werden.

Durch die Anwesenheit mehrerer Bakterienarten in der zu untersuchenden Probe kann die Auswertbarkeit des Tests beeinträchtigt werden.

Theoretisch kann trotz eines angezeigten Wildtyp-Musters eine Resistenz vorliegen. Enthält die getestete Probe einen heterogenen Stamm, der zum Zeitpunkt der Untersuchung nur zum Teil eine nicht durch die Mutations-Sonden abgedeckte Resistenz ausgebildet hat, tritt ein Wildtyp-Bandenmuster auf. Enthält die Probe mehr als einen *M. tuberculosis*-Stamm (durch Mischkultur oder Kontamination) und weist einer von diesen eine nicht durch die Mutations-Sonden abgedeckte Mutation

auf, tritt ebenfalls ein Wildtyp-Bandenmuster auf. Wie bei anderen diagnostischen Tests müssen die Ergebnisse dieses Nachweises in Verbindung mit anderen dem behandelnden Arzt zur Verfügung stehenden Labordaten und klinischen Daten interpretiert werden.

Vor der Amplifikation muss bakterielle DNA aus Kulturproben oder pulmonalem mikroskopisch-positivem Direktmaterial mit Hilfe eines geeigneten DNA-Isolierungsverfahrens extrahiert werden. Es muss gewährleistet sein, dass es während der Amplifikation zu einer effizienten Vervielfältigung der Ausgangs-DNA kommt. Dieser Test und die daraus resultierende Aussage beziehen sich ausschließlich auf die Genomabschnitte, aus denen die spezifischen Sonden ausgewählt wurden. Eine eventuelle Sequenzanalyse bleibt weiterführenden Untersuchungen vorbehalten.

Wie bei jedem Nachweissystem auf Hybridisierungs-Basis besteht auch bei dem vorliegenden Testsystem die Möglichkeit, dass Sequenzvariationen in den Genombereichen, aus denen die Primer und Sonden gewählt wurden, für deren Detektion der Test aber nicht konzipiert ist, zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Aufgrund der hohen Variabilität von Bakteriengenomen ist es daher möglich, dass bestimmte Subtypen nicht erkannt werden. Der Test spiegelt den aktuellen Kenntnisstand der Firma Hain Lifescience wider.

Dieser Test ist nur von Fachpersonal durchzuführen, welches im Testverfahren geschult wurde und mit molekularbiologischen Techniken vertraut ist. Die Leistungsbewertungsprüfung dieses Testsystems wurde mit der HotStarTaq-Polymerase der Fa. Qiagen (Hilden) durchgeführt.

Troubleshooting

Durchweg schwache oder gar keine Banden (inkl. Konjugatkontrolle)

- Raumtemperatur zu niedrig oder Reagenzien nicht auf Raumtemperatur äquili-
briert.
- CON-C und/oder SUB-C nicht oder in zu geringer Menge eingesetzt.

Schwache oder keine Banden mit Ausnahme der Konjugatkontrolle

- Qualität und/oder Quantität der isolierten DNA lassen keine effiziente Amplifika-
tion zu. Amplifikationsprodukte in einem 2%igen Agarose-Gel überprüfen. Falls
kein Amplifikat sichtbar ist, DNA-Isolierung und -Amplifikation wiederholen; evtl.
eine andere DNA-Isolierungsmethode einsetzen (s. Kapitel DNA-Isolierung).
- Inkubationstemperatur zu hoch.

Inhomogene Färbung

- Membranstreifen zeitweise nicht vollständig eingetaucht.
- Wanne während der Inkubation nicht ausreichend bewegt.

Hohe Hintergrundfärbung

- CON-C und/oder SUB-C zu konzentriert eingesetzt.
- Unzureichend gewaschen.
- Waschlösungen zu kalt.

Unerwartetes Ergebnis

- Falsche Inkubationstemperatur.
- Hybridisierungspuffer und/oder Stringent-Waschlösung nicht ausreichend erwärmt
oder nicht ausreichend gemischt.
- Kontamination der isolierten DNA oder der Amplifikationsreagenzien durch zuvor
isolierte oder amplifizierte DNA. Bei einer Kontamination der Amplifikationsre-
agenzien zeigt auch eine mitgeführte Negativ-Kontrollprobe ein entsprechendes
Bandenmuster.
- Kontamination benachbarter Kavitäten während der Zugabe von Hybridisierungspuffer.

- In Abhängigkeit von der Menge an eingesetzter amplifizierter DNA und den speziellen Reaktionsbedingungen kann es zu einer starken und schnellen Farb-reaktion kommen. In solchen Fällen die Substratinkubation abbrechen, sobald die Banden gut sichtbar sind, da es sonst zu falsch-positiven Farbreaktionen kommen kann.
- Keine Reinkultur als Ausgangsmaterial oder mehr als eine Mutation im getesteten Stamm.
- Stille Mutation im Sondenbereich (s. Kapitel Grenzen der Methode).

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

- Einmal-Handschuhe
- Horizontalschüttler/**TwinCubator**[®]
- Messzylinder
- PCR-Reaktionsgefäße, DNase- und RNase-frei
- Pinzette
- Pipetten (variabel im Bereich bis 10, 20, 200 und 1000 µl)
- Reagenzien zur DNA-Isolierung für Amplifikationsanwendungen sowie hierfür notwendige Geräte
- Saugpapier
- Schüttelwasserbad/**TwinCubator**[®]
- Sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Thermocycler
(Heizrate: 3°C/sec, Kühlrate: 2°C/sec, Regelgenauigkeit: +/-0,2°C)
- Thermometer, kalibriert
- Thermostabile DNA-Polymerase inkl. Puffer (Empfehlung: „Hot Start“-Enzym, Extensionsrate: 2-4 kb/min bei 72°C, Halbwertszeit: 10 min bei 97°C, 60 min bei 94°C, Amplifikationseffizienz: >10⁵-fach)
- Wasser (*molecular biology grade*)
- Zeitmesser

Bestandteile des Kits

	Gelieferte Menge	
Membranstreifen beschichtet mit spezifischen Gensonden (STRIPS)	12	96
Primer-Nukleotid-Mix (PNM) enthält spezifische Primer, Nukleotide, <1% Dimethylsulfoxid, Farbstoff	0,5 ml	4 ml
Denaturierungsreagenz (DEN) gebrauchsfertig enthält <2% NaOH, Farbstoff	0,3 ml	2,4 ml
Hybridisierungspuffer (HYB) gebrauchsfertig enthält 8-10% anionisches Tensid, Farbstoff	20 ml	120 ml
Stringent-Waschlösung (STR) gebrauchsfertig enthält >25% einer quartären Ammoniumverbindung, <1% anionisches Tensid, Farbstoff	20 ml	120 ml
Rinse-Lösung (RIN) gebrauchsfertig enthält Puffersubstanz, <1% NaCl, <1% anionisches Tensid	50 ml	360 ml
Konjugat-Konzentrat (CON-C) Konzentrat enthält Streptavidin-konjugierte Alkalische Phosphatase, Farbstoff	0,2 ml	1,2 ml
Konjugat-Puffer (CON-D) enthält Puffersubstanz, 1% Blocking-Reagenz, <1% NaCl	20 ml	120 ml
Substrat-Konzentrat (SUB-C) Konzentrat enthält Dimethylsulfoxid, Substratlösung	0,2 ml	1,2 ml
Substrat-Puffer (SUB-D) enthält Puffersubstanz, <1% MgCl ₂ , <1%NaCl	20 ml	120 ml
Inkubationswanne, Auswertungsbogen	je 1	je 4
Arbeitsanleitung, Schablone	je 1	je 1

Bestellinformationen

GenoLyse® für 96 Proben

Art.-Nr.: 51610

GenoType® MTBDRplus **Molecular Genetic Assay for Identification of Resistance** **to Rifampicin and/or Isoniazid of the *Mycobacterium*** ***tuberculosis* Complex**

Methodology

The **GenoType® MTBDRplus** test is based on the **DNA•STRIP®** technology and permits the molecular genetic identification of the *M. tuberculosis* complex and its resistance to rifampicin and/or isoniazid from cultivated samples or pulmonary smear-positive direct patient material. The identification of rifampicin resistance is enabled by the detection of the most significant mutations of the *rpoB* gene (coding for the β -sub-unit of the RNA polymerase). For testing of high level isoniazid resistance, the *katG* gene (coding for the catalase peroxidase) is examined and for testing of low level isoniazid resistance, the promoter region of the *inhA* gene (coding for the NADH enoyl ACP reductase) is examined.

The whole procedure is divided into three steps: DNA extraction from cultured material (culture plates/liquid medium) or direct materials (pulmonary, smear-positive, decontaminated) – the necessary reagents are not provided, a multiplex amplification with biotinylated primers (the necessary thermostable DNA polymerase is not provided), and a reverse hybridization.

The hybridization includes the following steps: chemical denaturation of the amplification products, hybridization of the single-stranded, biotin-labeled amplicons to membrane-bound probes, stringent washing, addition of a streptavidin/alkaline phosphatase (AP) conjugate, and an AP mediated staining reaction. A template ensures the easy and fast interpretation of the banding pattern obtained.

Storage and Precautions

Store Primer/Nucleotide Mix (PNM) at 2-8°C upon arrival isolated from any potential source of contaminating DNA. If longer storage (more than 4 weeks) is required, store at -20°C. In order to avoid repeated freezing and thawing, aliquot PNM. Store all other kit components at 2-8°C. Do not use the reagents beyond their expiry date.

Patient specimens and cultures made from patient specimens must always be considered as potentially infectious. Samples from risk patients and cultures made

from those samples must always be labeled and handled under suitable safety conditions. Observe all federal, state, and local safety and environmental regulations. Always wear suitable protective clothing and gloves. Specimen treatment and sample preparation up to and including the heat inactivation step must be carried out in a class II safety cabinet. Before the heat inactivation step samples must be centrifuged in an aerosol-tight rotor. Open aerosol-tight rotor in safety cabinet only. After heat inactivation a standard rotor can be used for spinning the samples outside the safety cabinet.

Observe the usual precautions for amplification set-up. It is essential that all reagents and materials used for DNA extraction and amplification set-up are free from DNases.

When handling kit reagents, the following special safety measures must be applied:

The **Denaturation Solution** (DEN) contains <2% NaOH and is irritating to eyes and skin (R 36/38 and S 26-37/39-45).

The **Substrate Concentrate** (SUB-C) contains Dimethyl Sulfoxide and is irritating (R 36/37/38, S 23-26-36).

For additional information, please refer to material safety data sheets which can be downloaded from: www.hain-lifescience.com/products/msds.html

Quality Control

In order to validate the correct performance of the test and the proper functioning of reagents, each strip includes 5 control zones:

- a Conjugate Control zone to check the binding of the conjugate on the strip and a correct chromogenic reaction
- an Amplification Control zone to check for a successful amplification reaction
- three Locus Control zones (*rpoB*, *katG*, and *inhA*) checking the optimal sensitivity of the reaction for each of the tested gene loci

DNA Extraction

Bacteria grown on culture plates (e. g. Loewenstein-Jensen, Middlebrook) or in liquid medium (e. g. BACTEC, MB-Check) may be used, as well as smear-positive direct material (pulmonary samples). The test must not be used to detect mycobacteria directly from smear-negative patient material. The working area must be free from

amplified DNA. It is crucial to heat samples to 95°C for at least 20 min in order to inactivate vegetative bacteria. Any DNA extraction procedure producing amplifiable DNA from bacteria can be used. The following quick protocol normally also yields DNA suitable for amplification:

- 1a. When using bacteria grown on solid medium, collect bacteria with an inoculation loop and suspend in approximately 300 µl of water (molecular biology grade).
 - 1b. When using bacteria grown in liquid media, directly apply 1 ml, when using direct patient material, apply 500 µl of a decontaminated* sample. Pellet bacteria by spinning for 15 min in a standard table top centrifuge with an aerosol-tight rotor in a class II safety cabinet at approximately 10000 x g. Discard supernatant and resuspend bacteria in 100-300 µl of water (for culture samples), or 100 µl of water (for direct patient material) by vortexing.
 2. Incubate bacteria from 1a or 1b for 20 min at 95°C in a water bath.
 3. Incubate for 15 min in an ultrasonic bath.
 4. Spin down for 5 min at full speed and directly use 5 µl of the supernatant for PCR. In case DNA solution is to be stored for an extended time period, transfer supernatant to a new tube.
- * Samples must be processed using the NALC/NaOH method according to the CDC publication "Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory".

Detailed protocols can be obtained from your local distributor or from:
www.hain-lifescience.de/pdf/dnaisol_myco.pdf

The assay on hand was also validated with the **GenoLyse**® kit (see chapter Ordering Information) which can alternatively be used for DNA isolation from direct material. For handling instructions, please refer to the manual of the **GenoLyse**® kit.

Amplification

Prepare the amplification mix (45 µl) in a DNA-free room. The DNA sample should be added in a separate area.

Per tube mix:

- 35 µl PNM
- 5 µl 10x polymerase incubation buffer – not provided
- x µl MgCl_2 solution¹⁾ – not provided
- 1-2 unit(s) thermostable DNA polymerase (refer to manual) – not provided
- y µl water to obtain a volume of 45 µl (not considering volume of enzyme) – not provided
- Add 5 µl DNA solution (20-100 ng DNA) leading to a final volume of 50 µl (not considering volume of enzyme).

¹⁾ Depending on the enzyme/buffer system used, the optimal MgCl_2 concentration may vary between 1.5 and 2.5 mM. Please note that some incubation buffers already contain MgCl_2 .

Determine the number of samples to be amplified (number of samples to be analyzed plus control samples). A negative control sample, for example, contains 5 µl of water instead of DNA solution. Prepare a master mix containing all reagents except for DNA solution and mix well (do not vortex). Aliquot 45 µl in each of the prepared PCR tubes.

Amplification profile:

	culture samples	direct patient material
5 min ²⁾ 95°C	1 cycle	1 cycle
30 sec 95°C 2 min 58°C	} 10 cycles	10 cycles
25 sec 95°C 40 sec 53°C 40 sec 70°C	} 20 cycles	30 cycles
8 min 70°C	1 cycle	1 cycle

²⁾ When using certain hot start DNA polymerases, this step has to be extended (please refer to manual of the enzyme).

Amplification products can be stored at +4 to -20°C.

For checking the amplification reaction, 5 µl of each sample might be directly applied to a 2% agarose gel without the addition of loading buffer. The amplicons have a length of approximately 63 bp (Amplification Control), 115 bp (*M. tuberculosis* complex), 166 bp (*rpoB*), 120 bp (*katG*), and 110 bp (*inhA*) respectively.

Hybridization

Preparation

Prewarm shaking water bath/**TwinCubator®** to **45°C**; the maximum tolerated deviation from the target temperature is +/-1°C. Prewarm solutions HYB and STR to 37-45°C before use. The reagents must be free from precipitates (note, however, that solution CON-D is opaque). Mix if necessary. Warm the remaining reagents with the exception of CON-C and SUB-C to room temperature. Using a suitable tube, dilute Conjugate Concentrate (CON-C, orange) and Substrate Concentrate (SUB-C, yellow) 1:100 with the respective buffer (**CON-C with CON-D, SUB-C with SUB-D**) in the amounts needed. Mix well and bring to room temperature. For each strip, add 10 µl concentrate to 1 ml of the respective buffer. Dilute CON-C before each use. Diluted SUB-C is stable for 4 weeks if stored at room temperature and protected from light.

1. **Dispense 20 µl of Denaturation Solution (DEN, blue) in a corner of each of the wells used.**
2. **Add to the solution 20 µl of amplified sample, pipette up and down to mix well and incubate at room temperature for 5 minutes.**

Meanwhile, take strips out of the tube using tweezers and mark them with a pencil underneath the colored marker. Always wear gloves when handling strips.

3. **Carefully add to each well 1 ml of prewarmed Hybridization Buffer (HYB, green). Gently shake the tray until the solution has a homogenous color.**

Take care not to spill solution into the neighboring wells.

4. **Place a strip in each well.**

The strips must be completely covered by the solution and the coated side (identifiable by the colored marker near the lower end) must face upward. Using tweezers, turn over strips which might have turned when immersed in the solu-

tion. Carefully clean tweezers after each use to avoid contamination. This also applies to all following steps.

- 5. Place tray in shaking water bath/TwinCubator® and incubate for 30 minutes at 45°C.**

Adjust the shaking frequency of the water bath to achieve a constant and thorough mixing of the solution. To allow adequate heat transfer, the tray must be dipped into the water to at least 1/3 of its height.

- 6. Completely aspirate Hybridization Buffer.**

For example, use a Pasteur pipette connected to a vacuum pump.

- 7. Add 1 ml of Stringent Wash Solution (STR, red) to each strip and incubate for 15 minutes at 45°C in shaking water bath/TwinCubator®.**

- 8. Work at room temperature from this step forward.**

Completely remove Stringent Wash Solution.

Pour out Wash Solution in a waste container and remove all remaining fluid by turning the tray upside down and gently striking it on an absorbent paper. This also applies to all other wash steps.

- 9. Wash each strip once with 1 ml of Rinse Solution (RIN) for 1 minute on shaking platform/TwinCubator® (pour out RIN after incubation).**

- 10. Add 1 ml of diluted Conjugate (see above) to each strip and incubate for 30 minutes on shaking platform/TwinCubator®.**

- 11. Remove solution and wash each strip twice for 1 minute with 1 ml of Rinse Solution (RIN) and once for 1 minute with approx. 1 ml of distilled water (e. g. use wash bottle) on shaking platform/TwinCubator® (pour out solution each time).**

Make sure to remove any trace of water after the last wash.

- 12. Add 1 ml of diluted substrate (see above) to each strip and incubate protected from light without shaking.**

Depending on the test conditions (e. g. room temperature), the substrate incubation time can vary between 3 and 20 minutes. Extended substrate incubation times can lead to increased background staining and might impair interpretation of the results.

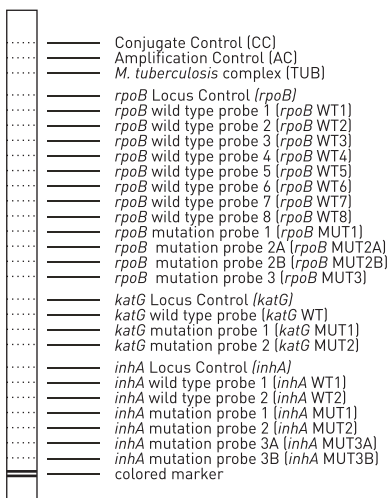
- 13. Stop reaction by briefly rinsing twice with distilled water.**

- 14. Using tweezers, remove strips from the tray and dry them between two layers of absorbent paper.**

Evaluation and Interpretation of Results

Paste strips and store protected from light. An evaluation sheet is provided with the kit and can be downloaded from:

www.hain-lifescience.de/pdf/mtbdrplus_evaluation.pdf. When using this evaluation sheet, paste the developed strips in the designated fields by aligning the bands CC and AC with the respective lines on the sheet. Determine the resistance status and note down in the respective column; as an help for interpretation, evaluation examples are given in the subsequent chapter. The supplied template also serves as an aid for evaluation and must be aligned with the bands CC and AC of the strip as well. Each strip has a total of 27 reaction zones (see figure).



Note: The strip is not displayed in original size and must not be used for interpretation purposes.

Not all bands of a strip have to show the same signal strength.

Conjugate Control (CC)

A line must develop in this zone, documenting the efficiency of conjugate binding and substrate reaction.

Amplification Control (AC)

When the test is performed correctly, a control amplicon will bind to the Amplification Control zone. If this band is developed, mistakes during extraction and amplification setup and the carry-over of amplification inhibitors can be excluded.

In case of a positive test result, the signal of the Amplification Control zone can be weak or even vanish totally. This might be due to competition reactions during amplification. In this case, however, the amplification reaction was performed correctly and the test does not have to be repeated.

A weak or missing AC band in case of a negative test result indicates mistakes during amplification set-up, or carry-over of amplification inhibitors. In this case, the test is not valid and the respective sample has to be repeated.

***M. tuberculosis* complex (TUB)**

This zone hybridizes, as known, with amplicons generated from all members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. If the TUB zone is negative, the tested bacterium does not belong to the *M. tuberculosis* complex and cannot be evaluated by this test system.

Locus Controls (*rpoB*, *katG*, and *inhA*)

The Locus Control zones detect a gene region specific for the respective locus and must always stain positive.

Wild type probes

The wild type probes comprise the most important resistance areas of the respective genes (see figure 1, table 1, 2, and 3). When all wild type probes of a gene stain positive, there is no detectable mutation within the examined regions. Hence the strain tested is sensitive for the respective antibiotic.

In case of a mutation, the respective amplicon cannot bind to the corresponding wild type probe. The absence of a signal for at least one of the wild type probes hence indicates a resistance of the tested strain to the respective antibiotic.

Only those bands whose intensities are about as strong as or stronger than that of the Amplification Control zone are to be considered

Each pattern deviating from the wild type pattern indicates resistance of the tested strain. The banding pattern obtained with the *rpoB* probes allows to draw a conclusion about a rifampicin resistance of the strain tested, the banding pattern obtained with the *katG* probes allows to draw a conclusion about a high level isoniazid resistance, the banding pattern obtained with the *inhA* probes allows to draw a conclusion about a low level isoniazid resistance of the strain tested, respectively.

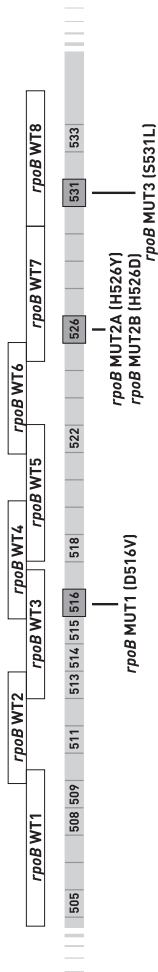


Figure 1 : Rifampicin resistance region of the *rpoB* gene

rpoB WT1-8: *rpoB* wild type probes; *rpoB* MUT1-3: *rpoB* mutation probes. The numbers specify the positions of the amino acids [codons] for all mutations listed in the table. The codons for which mutation probes were designed are highlighted.

Mutation probes

The mutation probes detect some of the most common resistance mediating mutations (see table 1, 2, and 3). Compared to the other probes, positive signals of the mutation probes *rpoB* MUT2A and MUT2B may show a lower signal strength.

Only those bands whose intensities are about as strong as or stronger than that of the Amplification Control zone are to be considered.

Each pattern deviating from the wild type pattern indicates resistance of the tested strain. The banding pattern obtained with the *rpoB* probes allows to draw a conclusion about a rifampicin resistance of the strain tested, the *katG* banding pattern about a high level and the *inhA* banding pattern about a low level isonazid resistance, respectively.

Note the following special cases:

1. There is a possibility that the specimen tested contains a heterogeneous strain. If, at investigation, this strain has developed only a partial resistance, one of the mutation probes as well as the corresponding wild type probe may appear.
2. There is a possibility that the tested specimen contains more than one *M. tuberculosis* strain (due to mixed culture or contamination). If at least one of these strains harbors a mutation, one of the mutation probes as well as the corresponding wild type probe may appear.

Table 1: Mutations in the gene *rpoB* and the corresponding wild type and mutation probes (modified according to Telenti et al. 1993, Lancet, 341: 647-650)

failing wild type probe(s)	codons analyzed	mutation probe	mutation
<i>rpoB</i> WT1	505-509		F505L T508A S509T
<i>rpoB</i> WT2	510-513		L511P*
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517		Q513L* Q513P del514-516
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<i>rpoB</i> MUT1	D516V D516Y del515
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522		del518* N518I
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>rpoB</i> WT7	526-529	<i>rpoB</i> MUT2A <i>rpoB</i> MUT2B	H526Y H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<i>rpoB</i> MUT3	S531L S531P S531Q* S531W L533P

* This rare mutation has only been detected theoretically (*in silico*) yet. It is therefore possible that the mutation cannot be detected *in vitro*.

Table 2: Mutations in the gene *katG* and the corresponding wild type and mutation probes

failing wild type probe(s)	codons analyzed	mutation probe	mutation
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1	S315T1
		<i>katG</i> MUT2	S315T2

Table 3: Mutations in the *inhA* promotor region and the corresponding wild type and mutation probes

failing wild type probe	analyzed nucleic acid position	mutation probe	mutation
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T8A

Evaluation Examples

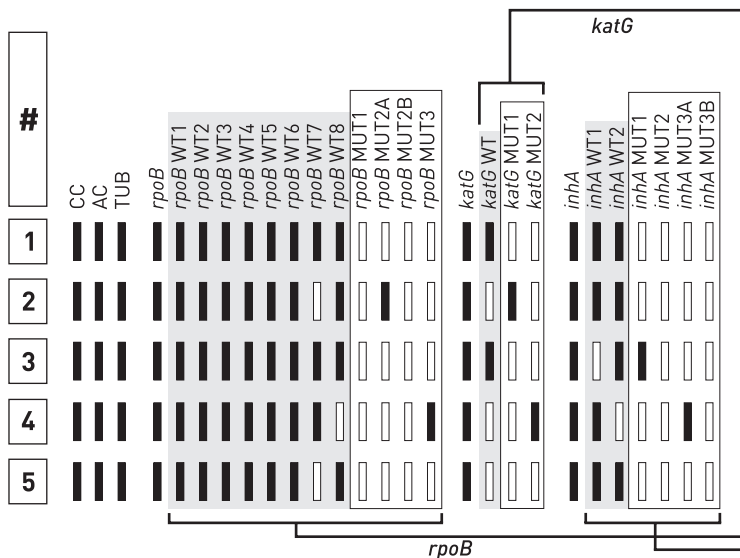


Figure 2: Examples for banding patterns and their evaluation with respect to rifampicin and/or isoniazid resistance

If all wild type bands display a signal, this is classified as positive and marked in the WT column of the respective gene as “+”. If at least one of the wild type bands is absent, this is classified as negative and marked in the WT column of the same gene as “-”. Negative entries are only made to the mutation columns when none of the mutation bands display a coloration. If at least one of the mutation bands display coloration, this is classified as mutation-positive.

								RMP		INH	
TUB	<i>rpoB</i> WT	<i>rpoB</i> MUT	<i>katG</i> WT	<i>katG</i> MUT	<i>inhA</i> WT	<i>inhA</i> MUT		sensitive	resistant	sensitive	resistant
+	+	-	+	-	+	-	+			+	
+	-	+	-	+	+	-		+			+
+	+	-	+	-	-	+	+				+
+	-	+	-	+	-	+		+			+
+	-	-	-	-	+	-		+			+

inhA

Example 1 shows the wild type banding pattern. All wild type probes display a signal, but none of the mutations probes; hence, the evaluation chart has a “+” in the three wild type columns and a “-” in the three mutation columns. Accordingly, the boxes for rifampicin (RMP) and isoniazid (INH) are marked as sensitive.

One of the *rpoB* and the *katG* wild type probes are missing in example 5; hence, the boxes for *rpoB* WT and *katG* WT are marked with a “-”. As none of the mutation probes are developed, these boxes are also marked with a “-”. The *inhA* promoter region does not deviate from the wild type pattern. The strain is evaluated as RMP and INH resistant. The INH resistance is caused by a mutation in the *katG* gene and is therefore a high level isoniazid resistance.

Limitations

The statements given in this manual concerning the capacities of the method refer to culture samples and pulmonary smear-positive direct material. The available data about extrapulmonary smear-positive direct material is not sufficient to draw a conclusion about their applicability.

As with any DNA-based assay, this test only screens the nucleic acid sequence and not the amino acid sequence. Therefore, it is possible that mutations that do not cause an amino acid exchange (silent mutations) will still produce the absence of one of the wild type probes.

Newest data indicate that in spite of a L533P mutation the respective *M. tuberculosis* strain may still be RMP sensitive. Hence, if the band WT8 is absent and the *rpoB* MUT3 probe does not develop, results of the phenotypical resistance determination should be considered.

In recent years additional mutations within the tested *rpoB* gene region causing rifampicin resistance have been published. As these mutations are very rare, they were not accessible for validation purposes of this test system but were only detected *in silico*. An *in silico* detection, however, does not exclude the possibility that some of these mutations cannot be detected *in vitro*.

The **GenoType® MTBDRplus** test only detects those resistances of the *M. tuberculosis* complex that have their origins in the *rpoB*, *katG* and *inhA* regions examined here. Resistances originating from mutations of other genes or gene regions as well as other rifampicin and isoniazid resistance mechanisms will not be detected by this test.

The user must have or acquire information about the local mutation distribution pattern of the genes investigated with this test.

The presence of multiple bacterial species in the sample to be analyzed might hamper the interpretation of the test.

Theoretically, a resistance can exist in spite of a wild type pattern. If, at investigation, the sample contains a strain that has developed only a partial resistance that is not covered by the mutation probes, the wild type pattern will appear. If the sample contains more than one *M. tuberculosis* strain (due to mixed culture or contamination) and one of these harbors a mutation that is not covered by the mutation probes, the wild type pattern will appear. As with other diagnostic assays, the results of this test may only be interpreted in combination with additional laboratory and clinical data available to the responsible physician.

Prior to amplification, DNA has to be extracted from cultured bacteria or pulmonary smear-positive direct patient material using a suitable method. It must be ensured that the template DNA is efficiently amplified during the amplification reaction.

The test only works within the limits of the genomic regions the probes were chosen from. Potential sequence analysis remains reserved to resuming investigations.

As with any detection system on hybridization basis the test system on hand bears the possibility that sequence variations in the genomic regions the primers and probes were chosen from but the detection of which the test was not designed for may lead to false results. Due to the high variability of bacterial genomes it is possible that certain sub-types might not be detected. The test reflects the state of knowledge of Hain Lifescience.

Use of this assay is limited to qualified personnel well trained in the test procedure and familiar with molecular biological methods.

Performance evaluation of this assay was carried out using the HotStarTaq polymerase from Qiagen (Hilden, Germany).

Troubleshooting

Overall weak or no signals (including Conjugate Control zone)

- Room temperature too low or reagents not equilibrated to room temperature.
- No or too little amount of CON-C and/or SUB-C used.

Weak or no signals except for Conjugate Control zone

- Quality and/or quantity of extracted DNA do not allow an efficient amplification. Check amplicon on a 2% agarose gel. In case no amplicon is visible, repeat DNA extraction and amplification. If necessary, try a different DNA extraction method (see chapter DNA Extraction).
- Incubation temperature too high.

No homogeneous staining

- Strips were not completely immersed during incubation steps.
- Tray was not shaken properly.

High background color

- CON-C and/or SUB-C used too concentrated.
- Washing steps were not performed with the necessary care.
- Wash solutions too cold.

Unexpected result

- Wrong incubation temperature.
- Hybridization Buffer and/or Stringent Wash Solution were not properly prewarmed or mixed.
- Contamination of extracted DNA and/or amplification agents with extracted and/or amplified DNA. In case amplification agents are contaminated a negative control sample also shows the respective banding pattern.
- Contamination of neighboring wells by spillage during addition of Hybridization Buffer.
- Depending on the amount of amplified DNA used and on the specific reaction conditions, a strong and fast color development may occur. In such cases, discontinue the substrate incubation as soon as the signals are clearly visible in order to prevent the development of cross-hybridizing bands.
- No pure culture as starting material or more than one mutation in the tested strain.
- Silent mutation in probe region (see chapter Limitations).

Material Required but not Provided

- Absorbent paper
- Adjustable pipettes for 10, 20, 200, and 1000 μ l
- Calibrated thermometer
- Disposable gloves
- Disposable sterile pipette tips with filter
- DNA extraction reagents for amplification use as well as necessary equipment
- Graduated cylinder
- PCR tubes, DNase and RNase free
- Shaking platform/**TwinCubator**[®]
- Shaking water bath/**TwinCubator**[®]
- Thermal cycler
(heating rate: 3°C/sec, cooling rate: 2°C/sec, precision: $\pm 0.2^\circ\text{C}$)
- Thermostable DNA polymerase with buffer (recommendation: hot start enzyme, extension rate: 2-4 kb/min at 72°C, half-life: 10 min at 97°C, 60 min at 94°C, amplification efficiency: $>10^5$ fold)
- Timer
- Tweezers
- Water (molecular biology grade)

Kit Contents

	Supplied	
Membrane strips coated with specific probes (STRIPS)	12	96
Primer Nucleotide Mix (PNM) contains specific primers, nucleotides, <1% Dimethyl Sulfoxide, dye	0.5 ml	4 ml
Denaturation Solution (DEN) ready to use contains <2% NaOH, dye	0.3 ml	2.4 ml
Hybridization Buffer (HYB) ready to use contains 8-10% anionic tenside, dye	20 ml	120 ml
Stringent Wash Solution (STR) ready to use contains >25% of a quaternary ammonium compound, <1% anionic tenside, dye	20 ml	120 ml
Rinse Solution (RIN) ready to use contains buffer, <1% NaCl, <1% anionic tenside	50 ml	360 ml
Conjugate Concentrate (CON-C) concentrate contains streptavidin-conjugated alkaline phosphatase, dye	0.2 ml	1.2 ml
Conjugate Buffer (CON-D) contains buffer, 1% blocking reagent, <1% NaCl	20 ml	120 ml
Substrate Concentrate (SUB-C) concentrate contains Dimethyl Sulfoxide, substrate solution	0.2 ml	1.2 ml
Substrate Buffer (SUB-D) contains buffer, <1% MgCl ₂ , <1% NaCl	20 ml	120 ml
tray, evaluation sheet	1 of each	4 of each
manual, template	1 of each	1 of each

Ordering Information

GenoLyse® for 96 samples

order no. 51610

GenoType® MTBDRplus

Test Génétique de Détection Des Résistances à la Rifampicine et/ou à l'Isoniazide du Complexe *Mycobacterium tuberculosis*

Principe

Le test **GenoType® MTBDRplus** est basé sur la technologie **DNA•STRIP®** et permet l'identification du complexe *M. tuberculosis* et des résistances à la rifampicine et/ou l'isoniazide à partir de la culture ou de prélèvements pulmonaires présentant un examen microscopique positif. L'identification de la résistance à la rifampicine est réalisée à travers la détection des principales mutations au niveau du gène *rpoB* (qui code pour la sous-unité β de l'ARN polymérase). L'identification de résistances de haut niveau à l'isoniazide est réalisée à travers l'analyse du gène *katG* (qui code pour la peroxydase-catalase). L'identification de résistances de bas niveau à l'isoniazide est réalisée à travers l'analyse du promoteur du gène *inhA* (codant pour la NADH enoyl ACP reductase)

La procédure complète comporte trois phases : extraction de l'ADN à partir de cultures (bactéries cultivées en milieu solide ou liquide) ou prélèvements cliniques (prélèvements pulmonaires avec examen microscopique positif, et décontaminés) – les réactifs requis pour l'extraction de l'ADN ne sont pas fournis, une amplification multiplex à l'aide d'amorces biotinylées (ADN polymérase thermostable non fournie), et hybridation inverse.

Cette dernière phase comporte les étapes suivantes : dénaturation chimique de l'ADN amplifié, hybridation des amplicons simples brins biotinylés aux sondes pré-immobilisées sur la membrane, lavage stringent, et enfin addition d'un conjugué streptavidine/phosphatase alcaline suivie d'une révélation chromogénique. Les signaux obtenus sont facilement et rapidement interprétés à l'aide d'une matrice fournie avec chaque kit.

Conservation et Précautions

Dès réception, conserver le Mélange Amorces/Nucléotides (PNM) à 2-8°C et isolés de toute source d'ADN potentiellement contaminante. Si la durée de conservation doit excéder 4 semaines, conserver à -20°C. Il est recommandé d'aliquoter le PNM afin d'éviter les congélations/décongélations répétées. Conserver tous les autres composants du kit à 2-8°C. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date de péremption.

Les échantillons, prélevés sur patient ou à partir de culture doivent toujours être considérés comme potentiellement infectieux. Les échantillons et les cultures provenant de patients à risque doivent toujours être étiquetés et manipulés dans des conditions de sécurité adaptées. Suivre les recommandations (fédérale, nationale, locale) d'hygiène, de sécurité et d'environnement. Se protéger à l'aide de vêtements adéquats et de gants. Le traitement et la préparation des échantillons, jusqu'à l'étape d'inactivation par la chaleur, doivent être opérés dans un environnement sécurisé de classe II. Préalablement à l'étape d'inactivation par la chaleur, les échantillons doivent être centrifugés à l'aide d'un rotor protégeant contre les aérosols. Ouvrir le rotor uniquement dans un environnement sécurisé. Après l'étape d'inactivation par la chaleur, un rotor standard peut être utilisé pour la centrifugation des échantillons en dehors d'un environnement sécurisé.

Observer les précautions usuelles pour la préparation de l'amplification. Il est essentiel que le matériel et les réactifs utilisés pour l'extraction de l'ADN et pour la préparation de l'amplification soient exempts de DNases.

Lors de la manipulation du kit, tenir compte des indications de sécurité suivantes :

La **Solution de Dénaturation** (DEN) contient du NaOH (<2%) et est irritante pour la peau et les yeux (R 36/38 et S 26-37/39-45).

Le **Substrat Concentré** (SUB-C) contient du Dimethyl Sulfoxide et est irritante (R 36/37/38, S 23-26-36).

Pour des informations supplémentaires, consulter les fiches de sécurité, qui peuvent également être téléchargées à l'adresse suivante :

www.hain-lifescience.com/products/msds.html

Contrôle de Qualité

Afin de contrôler le bon déroulement du test et le bon fonctionnement des réactifs, chaque bandelette comporte 5 zones de contrôle :

- une zone de Contrôle Conjugué pour contrôler la fixation du conjugué sur la bandelette et le bon déroulement de la révélation chromogénique
- une zone de Contrôle d'Amplification afin de vérifier que la réaction d'amplification a été accomplie avec succès.
- trois zones de Contrôles des Loci (*rpoB*, *katG* et *inhA*) pour contrôler la sensibilité optimale pour chacun des loci testés

Extraction de l'ADN

L'ADN peut être extrait à partir de bactéries cultivées en milieu solide (ex : Loewenstein-Jensen, Middlebrook) ou en milieu liquide (ex : BACTEC, MB-Check), ainsi que sur des prélèvements positifs à l'examen microscopique (échantillons pulmonaires). Le test ne doit pas être utilisé pour la détection directe de mycobactéries à partir de prélèvements négatifs à l'examen microscopique. L'espace de travail doit être exempt de toute trace d'ADN amplifié. Il est primordial de chauffer les échantillons à 95°C pendant au moins 20 minutes de manière à inactiver les bactéries à l'état végétatif. Toutes les procédures d'extraction de l'ADN à partir de bactéries et produisant de l'ADN capable d'être amplifié peuvent être employées. Le protocole d'extraction rapide décrit ci-après permet également de préparer l'ADN en vue d'une amplification :

- 1a. A partir de bactéries cultivées en milieu solide : à l'aide d'une oeuze standard, prélever quelques colonies et les mettre en suspension dans approximative 300 µl d'eau (niveau de pureté pour Biologie Moléculaire).
- 1b. A partir de bactéries cultivées en milieu liquide, prélever directement 1 ml de milieu. A partir de prélèvements cliniques, utiliser 500 µl d'échantillon décontaminé*. Centrifuger pendant 15 minutes à 10000 x g sur une centrifugeuse de paillasse à l'aide d'un rotor protégeant contre les aérosols dans un environnement sécurisé de classe II. Jeter le surnageant et reprendre le culot dans 100-300 µl d'eau (pour les échantillons dérivés de la culture), ou 100 µl d'eau (pour les prélèvements directs). Vortexer.
2. Après les phases 1a ou 1b, incuber bactéries 20 min à 95°C dans le bain-marie.
3. Soniquer pendant 15 minutes dans un bain à ultra-sons.
4. Centrifuger 5 minutes à vitesse maximale. Utiliser directement 5 µl de surnageant pour la PCR. Si la solution d'ADN doit être conservée de façon prolongée, transférer le surnageant dans un nouveau tube.

* Les échantillons doivent être traités par NALC/NaOH selon la publication du CDC « Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory ».

Un protocole détaillé peut être obtenu chez votre distributeur ou à l'adresse internet : www.hain-lifescience.de/pdf/dnaisol_myc.pdf

Le test présent a aussi été validé avec le kit **GenoLyse®** (consulter chapitre Commandes) qui peut être utilisé alternativement à la méthode décrite en haut pour l'isolation d'ADN de prélèvements directs. Veuillez consulter le manuel d'utilisation du **GenoLyse®** pour de plus amples informations.

Amplification

Préparer le mélange réactionnel (45 µl) dans une pièce exempte d'ADN. L'ADN de l'échantillon doit être rajouté dans une pièce séparée.

Préparer le mélange suivant par tube :

- 35 µl de PNM
- 5 µl de tampon d'incubation de la polymérase 10x – non fourni
- x µl de $MgCl_2$ ¹⁾ – non fourni
- 1-2 unité(s) d'ADN polymérase thermostable
(se référer au manuel) – non fourni
- y µl d'eau qsp 45 µl (hors volume de l'enzyme) – non fourni
- Ajouter 5 µl de solution d'ADN (20-100 ng d'ADN) pour atteindre un volume final de 50 µl (hors volume de l'enzyme).

¹⁾ Selon le système tampon/enzyme utilisé, la concentration optimale de $MgCl_2$ peut varier de 1,5 à 2,5 mM. A noter que certains tampons contiennent déjà le $MgCl_2$.

Déterminer le nombre d'échantillons à amplifier (nombre d'échantillons à analyser + contrôles). Pour un contrôle négatif, par exemple, la solution d'ADN à amplifier est remplacée par 5 µl d'eau. Préparer une solution mère de mélange réactionnel contenant tous les réactifs à l'exception de l'ADN, et bien homogénéiser (ne pas vortexer). Aliquoter 45 µl du mélange réactionnel dans les tubes de PCR.

Profil d'amplification :

échantillons de culture		prélèvements cliniques
5 min ²⁾ 95°C	1 cycle	1 cycle
30 sec 95°C 2 min 58°C	10 cycles	10 cycles
25 sec 95°C 40 sec 53°C 40 sec 70°C	20 cycles	30 cycles
8 min 70°C	1 cycle	1 cycle

²⁾ La durée de cette étape doit être rallongée en cas d'utilisation d'ADN polymérase de type « hot start » (se référer au manuel de l'enzyme).

Les produits de l'amplification peuvent être conservés entre +4 et -20°C.

La réaction d'amplification peut être contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose 2% en déposant directement 5 µl de chaque échantillon (sans aucun tampon additionnel). Les amplicons produits présentent des longueurs respectives de 63 pb (Contrôle d'Amplification), de 115 bp (Complexe *M. tuberculosis*), de 166 pb (*rpoB*), de 20 pb (*katG*) et de 110 bp (*inhA*).

Hybridation

Préparation

Préchauffer le bain-marie agitateur/**TwinCubator®** à **45°C** (dérivation maximum : $\pm 1^{\circ}\text{C}$). Préchauffer les solutions HYB et STR à 37-45°C avant utilisation. Les réactifs ne doivent présenter aucun précipité (à noter cependant que la solution CON-D est opaque). Si besoin, agiter. Equilibrer les autres réactifs (à l'exception des solutions CON-C et SUB-C) à température ambiante. Dans un tube approprié, diluer le Con-jugué Concentré (CON-C, orange) et le Substrat Concentré (SUB-C, jaune) au 1:100 dans un volume adéquat du tampon correspondant (**CON-C avec CON-D, SUB-C avec SUB-D**). Bien homogénéiser et équilibrer à température ambiante. Pour chaque échantillon testé, ajouter 10 µl de concentré à 1 ml de tampon. Diluer CON-C avant chaque utilisation. Une fois dilué, SUB-C reste stable pendant 4 semaines conservé à température ambiante et à l'obscurité.

1. **Déposer 20 µl de Solution de Dénaturation (DEN, bleu) à une extrémité de chaque puits utilisé.**

2. **Ajouter 20 µl d'échantillon amplifié et mélanger les deux solutions par pipetages répétés. Incuber 5 minutes à température ambiante.**

Pendant ce temps, à l'aide d'une pince, sortir du tube le nombre approprié de bandelettes (STRIPS), et inscrire au crayon leur numéro d'identification dans l'espace situé sous le marquage coloré. Toujours porter des gants pour manipuler les bandelettes.

3. **Ajouter dans chaque puits 1 ml de Tampon d'Hybridation (HYB, vert) préchauffé et homogénéisé. Doucement agiter le bac jusqu'à ce que le mélange devienne une coloration homogène.**

Eviter les éclaboussures vers les autres puits.

4. **Déposer une bandelette dans chaque puits utilisé.**

Les bandelettes doivent être entièrement recouvertes par le liquide, avec la face sensibilisée (identifiable par le marquage coloré) tournée vers le haut. Les bandelettes mal orientées doivent être remises en position à l'aide de pincettes propres. Afin d'éviter toute contamination, bien nettoyer les pincettes après chaque utilisation. Cela vaut aussi pour toutes les étapes suivantes.

5. **Placer le bac dans bain-marie agitateur/TwinCubator® et incuber 30 minutes à 45°C.**

Pour le bain-marie agitateur sélectionner une fréquence d'agitation suffisante pour assurer un bon brassage du tampon. Ajuster le niveau de l'eau dans le bain-

marie agitateur au moins à un tiers de la hauteur du bac de façon à assurer un bon transfert de chaleur. Cela vaut aussi pour toutes les étapes suivantes.

6. **Aspirer le Tampon d'Hybridation.**

Utiliser par exemple une pipette pasteur reliée à une pompe à vide.

7. **Ajouter à chaque puits 1 ml de Solution de Lavage Stringent (STR, rouge) et incuber 15 minutes à 45°C dans le bain-marie agitateur/TwinCubator®.**

8. **À partir de cette étape, travailler à température ambiante.**

Éliminer la Solution de Lavage Stringent.

Vider la Solution de Lavage Stringent dans un container à déchets. Éliminer tout le liquide résiduel en retournant le bac sur du papier absorbant (effectuer de même pour les autres étapes de lavage).

9. **Laver chaque puits avec 1 ml de Solution de Rinçage (RIN) et incuber pendant 1 minute sous agitation (TwinCubator®/plateau agitateur). Vider la Solution de Rinçage.**

10. **Ajouter à chaque puits 1 ml de Conjugué dilué (voir ci-dessus) et incuber 30 minutes sous agitation (TwinCubator®/plateau agitateur).**

11. **Vider le contenu des puits et rincer sous agitation 1 minute à l'aide de 1 ml de Solution de Rinçage (RIN). Vider RIN. Répéter ce rinçage une nouvelle fois, puis rincer une fois avec environ 1 ml d'eau distillée à l'aide d'une pissette.**

Bien éliminer toute trace d'eau dans les puits après cette dernière étape.

12. **Ajouter 1 ml de Substrat dilué (voir ci-dessus) dans chaque puits et incuber sans agitation à l'obscurité.**

Le temps de révélation peut varier en fonction des conditions de déroulement du test (de 3 à 20 minutes), notamment de la température de la pièce. Des temps de révélation trop longs peuvent entraîner un bruit de fond qui peut gêner l'interprétation des résultats.

13. **Arrêter la réaction en rinçant brièvement deux fois à l'eau distillée.**

14. **À l'aide de pincettes, récupérer les bandelettes et les sécher entre deux couches de papier absorbant.**

Évaluation et Interprétation des Résultats

Classer et ranger les bandelettes à l'abri de la lumière. Une feuille d'évaluation est fournie avec le kit, mais peut également être téléchargée à l'adresse suivante : www.hain-lifescience.de/pdf/mtbdrplus_evaluation.pdf. Utilisation de la feuille d'évaluation : coller les bandelettes dans leur emplacement réservé, en alignant les bandes CC et AC des bandelettes avec les bandes CC et AC de la feuille. Déterminer le statut de résistance et noter le dans la colonne respective. Des exemples d'évaluation sont fournis dans le paragraphe suivant afin d'aider à l'interprétation. La matrice permet également d'évaluer les résultats en alignant de la même façon les bandes CC et AC des bandelettes et de la matrice. Chaque bandelette comprend 27 zones réactionnelles (voir figure).

.....	————	Contrôle Conjugué (CC)
.....	————	Contrôle d'Amplification (AC)
.....	————	Complexe <i>M. tuberculosis</i> (TUB)
.....	————	<i>rpoB</i> Zone de Contrôle (<i>rpoB</i>)
.....	————	<i>rpoB</i> Sonde Type Sauvage 1 (<i>rpoB</i> WT1)
.....	————	<i>rpoB</i> Sonde Type Sauvage 2 (<i>rpoB</i> WT2)
.....	————	<i>rpoB</i> Sonde Type Sauvage 3 (<i>rpoB</i> WT3)
.....	————	<i>rpoB</i> Sonde Type Sauvage 4 (<i>rpoB</i> WT4)
.....	————	<i>rpoB</i> Sonde Type Sauvage 5 (<i>rpoB</i> WT5)
.....	————	<i>rpoB</i> Sonde Type Sauvage 6 (<i>rpoB</i> WT6)
.....	————	<i>rpoB</i> Sonde Type Sauvage 7 (<i>rpoB</i> WT7)
.....	————	<i>rpoB</i> Sonde Type Sauvage 8 (<i>rpoB</i> WT8)
.....	————	<i>rpoB</i> Sonde mutation 1 (<i>rpoB</i> MUT1)
.....	————	<i>rpoB</i> Sonde mutation 2A (<i>rpoB</i> MUT2A)
.....	————	<i>rpoB</i> Sonde mutation 2B (<i>rpoB</i> MUT2B)
.....	————	<i>rpoB</i> Sonde mutation 3 (<i>rpoB</i> MUT3)
.....	————	<i>katG</i> Zone de Contrôle (<i>katG</i>)
.....	————	<i>katG</i> Sonde Type Sauvage (<i>katG</i> WT)
.....	————	<i>katG</i> Sonde mutation 1 (<i>katG</i> MUT1)
.....	————	<i>katG</i> Sonde mutation 2 (<i>katG</i> MUT2)
.....	————	<i>inhA</i> Zone de Contrôle (<i>inhA</i>)
.....	————	<i>inhA</i> Sonde Type Sauvage 1 (<i>inhA</i> WT1)
.....	————	<i>inhA</i> Sonde Type Sauvage 2 (<i>inhA</i> WT2)
.....	————	<i>inhA</i> Sonde mutation 1 (<i>inhA</i> MUT1)
.....	————	<i>inhA</i> Sonde mutation 2 (<i>inhA</i> MUT2)
.....	————	<i>inhA</i> Sonde mutation 3A (<i>inhA</i> MUT3A)
.....	————	<i>inhA</i> Sonde mutation 3B (<i>inhA</i> MUT3B)
.....	————	marquage coloré

Remarque : Cette bandelette n'est pas représentée dans sa taille originale et ne doit donc pas être utilisée pour l'interprétation.

Toutes les lignes d'une même bandelette peuvent ne pas présenter la même intensité.

Contrôle Conjugué (CC)

Une ligne colorée doit se développer dans cette zone. Cette ligne témoigne de la bonne fixation du conjugué et du bon déroulement de la révélation.

Contrôle d'Amplification (AC)

Lorsque le test a été correctement réalisé, un amplicon de contrôle se fixe dans la zone Contrôle d'Amplification. Le développement d'un signal à ce niveau exclut toute erreur durant les phases d'extraction et d'amplification, ainsi que la présence d'inhibiteurs. Lors de résultats positifs, le contrôle d'amplification peut présenter un signal faible ou même disparaître complètement, dû à un phénomène de compétition au cours de l'amplification. Néanmoins, il n'est pas nécessaire de répéter l'étape d'amplification.

Une bande AC inexistante en cas de tests négatifs indique une erreur au niveau de l'amplification, ou la présence d'inhibiteurs. Dans ce cas, le test n'est pas validé et les échantillons doivent être re-testés.

Complexe *M. tuberculosis* (TUB)

Au vue des connaissances actuelles, cette zone hybride avec les amplicons générés à partir de tous les membres connus du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. Si la zone TUB est négative, la bactérie testée n'appartient pas au complexe *M. tuberculosis* et ne peut donc être évaluée par ce système d'essai.

Zones de Contrôles (*rpoB*, *katG* et *inhA*)

Les zones de contrôles détectent des régions spécifiques de chaque locus testé et doivent toujours être positives.

Sondes Type Sauvage

Les sondes Type Sauvage comprennent les séquences non mutées de chaque région de gène à l'origine d'une résistance (voir figure 1, tables 1, 2 et 3). Lorsque tous les types sauvages d'un même gène sont positifs, il n'y a pas de mutation détectable au sein des régions examinées. La souche testée est sensible pour l'antibiotique correspondant.

En cas de mutation, l'amplicon produit ne peut pas s'hybrider à la sonde de type sauvage correspondante. L'absence de signal dans au moins un des sondes sauvages indique la résistance de la souche testée à l'antibiotique correspondant.

Seules les bandes dont l'intensité est égale ou supérieure à l'intensité du Contrôle d'Amplification doivent être prises en considération.

Tout profil déviant du profil sauvage indique une résistance de la souche testée. Le profil obtenu avec les sondes *rpoB* permet de conclure sur la résistance de la souche testée à la rifampicine ; le profil obtenu avec les sondes *katG* permet de conclure sur la résistance de haut niveau de la souche testée à l'isoniazide ; le profil obtenu avec les sondes *inhA* permet de conclure sur la résistance de bas niveau de la souche testée à l'isoniazide.

Sondes Mutations

Les sondes mutations détectent quelques unes des plus importantes mutations à l'origine de résistances. (voir tables 1, 2 et 3). Les signaux obtenus avec les sondes MUT2A et MUT2B peuvent apparaître plus faibles que les signaux obtenus avec les autres sondes.

Seules les bandes dont l'intensité est égale ou supérieure à l'intensité du Contrôle d'Amplification doivent être prises en considération.

Tout profil déviant du profil sauvage indique une résistance de la souche testée. Le profil obtenu avec les sondes *rpoB* permet de conclure sur la résistance de la souche testée à la rifampicine ; le profil obtenu avec les sondes *katG* permet de conclure sur la résistance de haut niveau de la souche testée à l'isoniazide ; le profil obtenu avec les sondes *inhA* permet de conclure sur la résistance de bas niveau de la souche testée à l'isoniazide.

Noter les cas spéciaux ci-après :

1. Possibilité que l'échantillon testé contienne une souche hétérogène. A l'analyse, la souche développe une résistance partielle, une des sondes mutées et le type sauvage correspondant peuvent apparaître.
2. Possibilité que l'échantillon testé contienne plus d'une souche de *M. tuberculosis*. (à la suite de cultures mélangées ou de contamination). Si au moins une des souches présente une mutation, une des sondes mutées ainsi que le type sauvage correspondant peuvent apparaître.

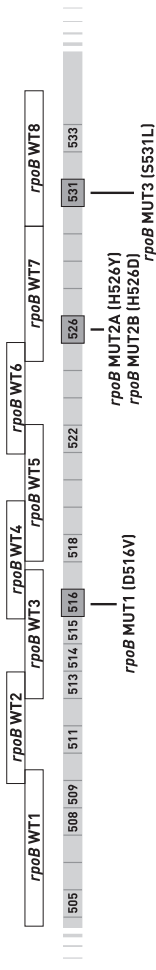


Figure 1 : Région du gène *rpoB* impliquée dans la résistance à la rifampicine.

rpoB WT1-8 : sondes *rpoB* type sauvage ; *rpoB* MUT1-3 : sondes *rpoB* mutées. Les nombres indiquent les positions des acides aminés (codons) pour toutes les mutations listées dans la table. Les codons pour lesquels une sonde a été conçue sont en gras.

Table 1 : Mutations au niveau du gène *rpoB* et sondes sauvages et mutées correspondantes (modifié d'après Telenti et al. 1993, Lancet, 341: 647-650)

Sonde(s) type sauvage manquante(s)	Codon analysé	Sonde mutation	Mutation
<i>rpoB</i> WT1	505-509		F505L
			T508A S509T
<i>rpoB</i> WT2	510-513		L511P*
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517		Q513L* Q513P del514-516
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<i>rpoB</i> MUT1	D516V D516Y del515
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522		del518* N518I
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>rpoB</i> WT7	526-529	<i>rpoB</i> MUT2A	H526Y
		<i>rpoB</i> MUT2B	H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<i>rpoB</i> MUT3	S531L S531P S531Q* S531W L533P

* Cette mutation rare a été détectée uniquement théoriquement (*in silico*). Il est par conséquent possible que cette mutation ne puisse pas être détectée *in vitro*.

Table 2 : Mutations au niveau du gène *katG* et sondes sauvages et mutées correspondantes

Sonde(s) type sauvage manquante(s)	Codon analysé	Sonde mutation	Mutation
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1	S315T1
		<i>katG</i> MUT2	S315T2

Table 3 : Mutations au niveau du promoteur du gène *inhA* et sondes sauvages et mutées correspondantes

Sonde(s) type sauvage manquante(s)	Position analysée d'acide nucléique	Sonde mutation	Mutation
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T8A

Exemples d'évaluation

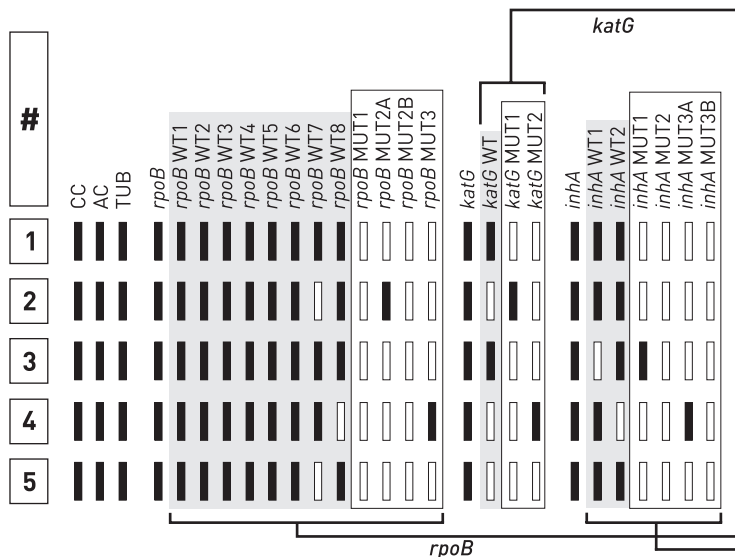


Figure 2 : Exemples de profils et leur évaluation concernant la résistance de rifampicine et/ou d'isoniazide.

Si toutes les bandes Type Sauvage développent un signal, le signal est classé positif et marqué « + » dans la colonne WT du gène correspondant.

Si au moins une des bandes Type Sauvage est absente, le signal est classé négatif et marqué « - » dans la colonne WT du gène correspondant. Les signaux « - » sont uniquement entrés dans les colonnes mutations lorsqu'aucune des bandes Mutations ne présente de signaux. Si au moins une bande Mutation présente un signal, le résultat est positif pour la mutation.

TUB	<i>rpoB</i> WT		<i>rpoB</i> MUT		<i>katG</i> WT		<i>katG</i> MUT		<i>inhA</i> WT		<i>inhA</i> MUT		RMP		INH	
	sensitive	resistant	sensitive	resistant	sensitive	resistant	sensitive	resistant	sensitive	resistant	sensitive	resistant	sensitive	resistant	sensitive	resistant
+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		+	
+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+
+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+			+
+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+		+		+
+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+		+		+

inhA

L'exemple 1 montre le profil sauvage. Toutes les sondes « sauvages » développent un signal, alors que les sondes « mutées » ne développent aucun signal. Le tableau de résultats présente un « + » dans les trois colonnes Type Sauvage et un « - » dans les trois colonnes Mutation. Ainsi, les cases Rifampicine (RMP) et isoniazide (INH) indiquent « Sensible ».

Dans l'exemple 5, une sonde sauvage de chaque gène *rpoB* et *katG* est manquante. Les cases *rpoB* WT et *katG* WT présentent un signe « - ». Comme aucune des sondes mutées ne développe de signal, les cases correspondantes sont également marquées « - ». Le promoteur de la région *inhA* ne varie pas par rapport au profil sauvage. La souche est donnée résistante à la rifampicine et à l'INH. La résistance à l'INH est conférée par la mutation au niveau du gène *katG* et est par conséquent de haut niveau.

Limitations

Les comptes-rendus présentés dans ce manuel sur les capacités de la méthode se rapportent aux échantillons dérivés de la culture et aux échantillons cliniques positifs à l'examen microscopique. Les données récoltées pour les échantillons directs extra-pulmonaires positifs à l'examen microscopique ne sont pas suffisantes pour conclure sur l'applicabilité du test.

Comme tout test de biologie moléculaire, ce test analyse la séquence d'acides nucléiques et non la séquence d'acides aminés. Il est donc possible qu'une mutation n'engendrant aucune modification d'acides aminés (mutation silencieuse) puisse être à l'origine de l'absence de développement d'une sonde de type sauvage.

Les données les plus récentes indiquent que malgré la présence de la mutation L533P, les souches de *M. tuberculosis* peuvent rester sensibles à la rifampicine. Ainsi, si la bande WT8 est absente et que la bande *rpoB* MUT3 n'est pas développée, la résistance phénotypique doit être considérée.

Ces dernières années, de nouvelles mutations au sein de la région testée du gène *rpoB*, et causant une résistance à la rifampicine, ont été identifiées. Ces mutations étant toutefois très rares, elles n'étaient pas accessibles pour le processus de validation du test et n'ont pu être détectées qu'*in silico*. Néanmoins, une détection *in silico* n'exclue pas la possibilité que certaines de ces mutations ne puissent pas être détectées *in vitro*.

Le test **GenoType® MTBDRplus** détecte seulement les résistances du complexe *M. tuberculosis* qui trouvent leurs origines dans les régions *rpoB*, *katG* et *inhA* analysées par le test. Les résistances qui ont pour origine des mutations dans d'autres gènes, ou les résistances autres qu'à la rifampicine ou à l'isoniazide ne seront pas détectées par le test.

Les utilisateurs du test doivent prendre connaissance des profils locaux de distribution des mutations pour les gènes analysés avec ce test.

La présence de différentes espèces bactériennes dans un même échantillon peut entraver l'interprétation du test.

En théorie, une résistance peut avoir lieu malgré le développement du profil sauvage. Si un échantillon contient une souche ayant développé une résistance partielle qui n'est pas couverte par les sondes mutées, des signaux se développeront au niveau des sondes type sauvage. Si l'échantillon contient plus d'une souche *M. tuberculosis* (due à culture mélangée ou à une contamination), et qu'une de ces souches présente une mutation non couverte par les sondes mutées, des signaux se développeront au niveau des sondes type sauvage.

Comme avec tout test de diagnostic, les résultats obtenus avec ce test doivent être interprétés en tenant compte de tout autre donnée de laboratoire ou clinique disponible au médecin responsable.

En vue de l'amplification, l'ADN doit être extrait à partir de culture de bactéries ou de prélèvements pulmonaires présentant un examen microscopique positif à l'aide d'une méthode appropriée. L'ADN cible doit avoir été amplifiée efficacement pendant la réaction d'amplification.

Le test fonctionne dans les limites de la région du génome choisie pour chaque sonde. Un séquençage potentiel doit être réalisés séparément.

Comme dans tout système de détection basé sur l'hybridation, il existe la possibilité que des variations situées dans la séquence d'ADN génomique cible à partir de laquelle les amorces et les sondes ont été choisies et pour lesquelles le test n'a pas été conçu, entraînent un résultat erroné. En raison de l'extrême variabilité des génomes bactériens, il est possible que certains sous-types puissent ne pas être détectés. Le test reflète l'état actuel des connaissances de la société Hain Lifescience.

L'utilisation de ce kit est réservée à un personnel qualifié déjà formé et rodé aux techniques de biologie moléculaire.

L'évaluation des performances du test a été réalisée à l'aide de la Taq polymérase HotStarTaq fournie par la société Qiagen (Hilden, Allemagne).

Causes d'Erreurs

Résultats faibles ou absence de signal (incluant la zone de Contrôle Conjugué)

- Température ambiante trop basse ou réactifs mal équilibrés.
- CON-C et/ou SUB-C n'a pas été ajouté ou était utilisé trop dilué.

Résultats faibles ou absence de signal, excepté dans la zone de Contrôle Conjugué

- La qualité et/ou la quantité de l'ADN extrait n'ont pas permis une amplification correcte. Analyser l'ADN amplifié sur un gel agarose 2%. Si aucun amplicon n'est visible, répéter les étapes d'extraction et d'amplification. Essayer éventuellement une autre méthode d'extraction de l'ADN (voir chapitre Extraction de l'ADN).
- Température d'incubation trop élevée.

Coloration non homogène

- Les bandelettes n'ont pas été suffisamment immergées lors des différentes incubations.
- Le bac n'a pas été correctement agité.

Bruit de fond important

- CON-C et/ou SUB-C utilisé(s) trop concentré(s).
- Les étapes de lavage n'ont pas été correctement effectuées.
- Les solutions de lavage étaient trop froides lors de leur utilisation.

Résultat inattendu

- Fausse température d'incubation.
- Solution d'Hybridation et/ou Solution de Lavage Stringent incorrectement équilibrés ou homogénéisés.
- Contamination de l'ADN extrait et/ou des réactifs d'amplification avec de l'ADN précédemment extrait ou amplifié. Lorsque les réactifs d'amplification sont contaminés, un échantillon de contrôle négatif entraîne également le développement des lignes tests.
- Contamination des puits voisins par des éclaboussures lors de l'addition de la Solution d'Hybridation.
- Dans certaines conditions du test, une forte concentration d'ADN amplifié peut entraîner une réaction chromogénique très rapide. En pareil cas, afin de prévenir le développement de bandes dues à des réactions d'hybridation croisées, arrêter la réaction chromogénique dès que les premières lignes colorées deviennent visibles.

- Matériel de départ constitué d'une culture non pure ou plus d'une mutation dans la souche testée.
- Mutation silencieuse dans la région de la sonde (voir chapitre Limitations).

Matériel Requis mais Non Fourni

- ADN polymérase thermostable avec tampon (enzyme de type « hot start » recommandée, taux d'extension : [2-4 kb/min à 72°C, demi-vie : 10 min à 97°C, 60 min à 94°C, rendement d'amplification : $>10^5$])
- Bain-marie agitateur/**TwinCubator®**
- Chronomètre
- Eau (niveau de pureté pour Biologie Moléculaire)
- Embouts de pipettes stériles avec filtre
- Eprouvette graduée
- Gants à usage unique
- Microtubes pour thermocycleur ; exempt de contamination par DNase et RNase
- Papier absorbant
- Pincettes
- Pipettes réglables pour 10, 20, 200, et 1000 µl
- Plateau agitateur/**TwinCubator®**
- Réactifs pour l'extraction de l'ADN ainsi que les appareils associés
- Thermocycleur (taux de chauffage : 3°C/sec, taux de refroidissement : 2°C/sec, précision : $\pm 0,2^\circ\text{C}$)
- Thermomètre calibré

Composition du Kit

	Quantité	
Bandelettes sensibilisées avec les sondes spécifiques (STRIPS)	12	96
Mélange de Amorces/Nucléotides (PNM) contient amorces spécifiques, nucléotides, <1% Diméthyl Sulfoxyde, colorant	0,5 ml	4 ml
Solution de Dénaturation (DEN) prêt à l'emploi contient <2% NaOH, colorant	0,3 ml	2,4 ml
Solution d'Hybridation (HYB) prêt à l'emploi contient 8-10% de détergent anionique, colorant	20 ml	120 ml
Solution de Lavage Stringent (STR) prêt à l'emploi contient >25% d'un sel d'ammonium quaternaire, <1% détergent anionique, colorant	20 ml	120 ml
Solution de Rinçage (RIN) prêt à l'emploi contient du tampon, <1% NaCl, <1% de détergent anionique	50 ml	360 ml
Conjugué Concentré (CON-C) concentré contient de la phosphatase alcaline conjugué à la streptavidine, colorant	0,2 ml	1,2 ml
Tampon Conjugué (CON-D) contient du tampon, 1% agent bloquant, <1% NaCl	20 ml	120 ml
Substrat Concentré (SUB-C) concentré contient du Dimethyl Sulfoxyde, solution substrat	0,2 ml	1,2 ml
Tampon Substrat (SUB-D) contient du tampon, <1% MgCl ₂ , <1% NaCl	20 ml	120 ml
bac, feuille d'évaluation	1 de chaque	4 de chaque
manuel d'utilisation, matrice	1 de chaque	1 de chaque

Commandes

GenoLyse® pour 96 échantillons

réf 51610

GenoType® MTBDRplus

Test genetico molecolare per l'identificazione della resistenza a Rifampicina e/o Isoniazide di *Mycobacterium tuberculosis* Complex

Metodologia

Il test **GenoType® MTBDRplus** si basa sulla tecnologia **DNA•STRIP®** e permette l'identificazione genetica molecolare del *M. tuberculosis* complex e la sua resistenza a rifampicina e/o isoniazide partendo da campioni in coltura o direttamente da campioni polmonari con microscopia positiva. L'identificazione della resistenza alla rifampicina viene effettuata tramite la rilevazione delle mutazioni più significative del gene *rpoB* (che codifica per la subunità β dell'RNA polimerasi). Per testare alti livelli di resistenza all'isoniazide, viene analizzato il gene *katG* (che codifica per la catalasi perossidasi) e per testare bassi livelli di resistenza all'isoniazide viene analizzata la regione promotrice del gene *inhA* (che codifica per la NADH enoil ACP reductasi).

L'intera procedura è suddivisa in tre fasi successive: Isolamento del DNA da materiale colturale (colonie batteriche cresciute su terreno solido/liquido) o da materiale biologico (campioni polmonari decontaminati con microscopia positiva) – i reattivi necessari non sono forniti – un'amplificazione multiplex mediante primers biotinilati (la necessaria DNA Polimerasi Termostabile non è fornita) e ibridazione inversa. L'ibridazione include i seguenti passaggi: la denaturazione chimica dei prodotti amplificati, l'ibridazione degli ampliconi biotinilati a singola elica con le sonde specifiche adese ad una membrana, un lavaggio stringente, l'aggiunta di un coniugato streptavidina/fosfatasi alcalina (AP) e infine di un substrato enzimatico cromogeno specifico per la AP. Una mascherina permette la facile e rapida interpretazione del pattern di bande ottenute.

Conservazione e precauzioni

Conservare la mix di primers e nucleotidi (PNM) a 2-8°C, in un luogo lontano da ogni possibile contaminazione con DNA. Se è necessaria una conservazione più prolungata (oltre 4 settimane) conservare a -20°C. Per evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti, si consiglia di aliquotare la PNM. Conservare tutti gli altri componenti a 2-8°C. Non utilizzare i reattivi oltre la loro data di scadenza.

I campioni prelevati dai pazienti e le colture ottenute da questi campioni devono essere sempre considerati potenzialmente infettivi. I campioni di pazienti a rischio

e le colture ottenute da questi campioni devono essere sempre etichettati e maneggiati in condizioni adeguate di sicurezza. Osservare tutte le norme legislative locali e nazionali in fatto di sicurezza e protezione dell'ambiente. Indossare sempre guanti e abiti protettivi. La preparazione e la lavorazione del campione fino al passaggio di inattivazione termica devono essere eseguiti sotto cappa sterile con codice di sicurezza di livello II. Prima del passaggio di inattivazione termica si devono centrifugare i campioni con un rotore con coperchio a tenuta di aerosol. Aprire il rotore a tenuta di aerosol sotto cappa di sicurezza. Dopo l'inattivazione termica può essere utilizzato un rotore normale fuori dalla cappa per una centrifugazione veloce dei campioni.

Osservare le consuete norme e precauzioni per l'esecuzione della reazione di amplificazione. E' essenziale che tutti i reattivi e i materiali utilizzati per l'estrazione del DNA e l'esecuzione dell'amplificazione siano privi di DNasi.

Nel maneggiare i reattivi del kit devono essere prese le seguenti speciali misure di sicurezza:

La **Soluzione di denaturazione** (DEN) contiene NaOH <2% ed è irritante per gli occhi e la pelle (R 36/38 e S 26-37/39-45).

Il **Substrato cromogeno concentrato** (SUB-C) contiene Dimetil-Solfossido ed è irritante (R 36/37/38, S 23-28-36).

Per ulteriori informazioni fare riferimento ai dati contenuti nella scheda di sicurezza che può anche essere scaricata dal sito:

www.hain-lifescience.com/products/msds.html

Controllo di qualità

Al fine di validare la corretta esecuzione del test e il regolare funzionamento dei reattivi, ogni striscia presenta 5 bande di controllo:

- una banda di Controllo del Coniugato per verificare l'avvenuto legame del coniugato sulla striscia e la corretta reazione cromogena
- una banda di Controllo di Amplificazione per controllare la riuscita della reazione di amplificazione
- tre bande di Controllo del Locus (*rpoB*, *katG* e *inhA*) per verificare la sensibilità ottimale della reazione per ciascuno dei loci dei geni testati

Isolamento del DNA

Utilizzare come campioni di partenza colonie batteriche cresciute su terreno solido (es. Loewenstein-Jensen, Middlebrook) o su terreno liquido (es. BACTEC, MB-Check) oppure materiale biologico (campioni polmonari) con vetrino positivo. Il test non può essere impiegato per rilevare i micobatteri direttamente da materiale biologico con microscopia negativa. L'area di lavoro deve essere libera da contaminazione con DNA amplificato. L'incubazione dei campioni a 95°C per almeno 20 minuti è indispensabile al fine di inattivare le forme vegetative dei batteri. Può essere utilizzata qualsiasi procedura di isolamento da materiale batterico in grado di produrre DNA amplificabile. La seguente procedura rapida può normalmente garantire DNA idoneo per l'amplificazione:

- 1a. Da coltura su terreno solido: raccogliere i batteri con un'ansa e sospenderli in 300 µl di acqua sterile per biologia molecolare.
- 1b. Da coltura su terreno liquido: prelevare direttamente 1 ml di sospensione batterica; da materiale biologico: prelevare 500 µl di campione decontaminato*. Creare un pellet di batteri centrifugando con una centrifuga con coperchio a tenuta di aerosol sotto cappa di sicurezza di livello II per 15 minuti a 10000 x g. Eliminare il surnatante e risospendere il pellet in 100-300 µl di acqua sterile (per campioni colturali), o 100 µl di acqua sterile (per materiale biologico) con vortex.
2. Incubare la sospensione ottenuta dalla procedura 1a o 1b per 20 minuti a 95°C in bagno d'acqua.
3. Incubare per 15 min in un bagno ultrasonico.
4. Centrifugare per 5 min alla massima velocità e utilizzare direttamente 5 µl del surnatante per la PCR. Nel caso non sia possibile processare subito il campione trasferire il surnatante in una nuova provetta.

* I campioni devono essere processati con il metodo NALC/NaOH in accordo con la pubblicazione: "Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory".

Maggiori dettagli sulle procedure di isolamento del DNA possono essere richiesti al vostro distributore o direttamente al produttore al sito:
www.hain-lifescience.de/pdf/dnaisol_myc.pdf

Il test é stato validato anche con il kit **GenoLyse®** (vedi capitolo Informazioni per gli ordini) che può essere usato come alternativa per l'isolamento del DNA da materiale biologico. Per le istruzioni operative fare riferimento al manuale del kit **GenoLyse®**.

Amplificazione

Preparare la mix di amplificazione (45 µl) in uno spazio lontano da possibile contaminazione con DNA. I campioni di DNA dovrebbero essere aggiunti in una stanza dedicata.

Per ogni campione miscelare:

- 35 µl di PNM
- 5 µl tampone specifico per polimerasi, 10x – non fornito
- x µl di soluzione di $MgCl_2$ ¹⁾ – non fornita
- 1-2 Unità di DNA polimerasi (riferirsi al manuale d'uso) – non fornita
- y µl di acqua. La quantità aggiunta deve portare ad un volume finale della mix di 45 µl (non considerare il volume dell'enzima) – non fornita
- Aggiungere 5 µl di soluzione di DNA (20-100 ng DNA) fino ad un volume finale di 50 µl (non considerare il volume della Taq).

¹⁾ La concentrazione ottimale di $MgCl_2$ dipende dal tipo di enzima usato e può variare fra 1,5 e 2,5 mM. Tener conto della quantità di $MgCl_2$ già eventualmente presente nel tampone.

Determinare il numero dei campioni da amplificare, considerando il numero dei campioni da analizzare e dei campioni di controllo. Per il controllo negativo aggiungere, ad esempio, 5 µl di acqua sterile invece della soluzione di DNA. Preparare una master mix contenente tutti i reagenti ad eccezione della soluzione di DNA e miscelare bene (non vortexare). Aliquotare la mix in volumi di 45 µl nelle provette per PCR precedentemente preparate.

Protocollo di amplificazione:

	campione colturale	materiale biologico
5 min ²⁾ 95°C	1 ciclo	1 ciclo
30 sec 95°C 2 min 58°C	10 cicli	10 cicli
25 sec 95°C 40 sec 53°C 40 sec 70°C	20 cicli	30 cicli
8 min 70°C	1 ciclo	1 ciclo

²⁾ Nel caso di utilizzo di un enzima di tipo "Hot Start" questo passaggio va prolungato (riferirsi al manuale dell'enzima).

I prodotti amplificati possono essere conservati ad una temperatura fra +4 e -20°C. Per verificare la reazione di amplificazione si possono caricare 5 µl di ogni campione su gel di agarosio al 2% senza l'aggiunta di tampone di caricamento. Gli ampliconi prodotti hanno rispettivamente una lunghezza di circa 63 bp (Controllo di Amplificazione), 115 bp (Complesso *M. tuberculosis*), 166 bp (*rpoB*), 120 bp (*katG*) e 110 bp (*inhA*).

Ibridazione

Preparazione

Preriscaldare a **45°C** il bagno termostato dotato di agitatore/**TwinCubator®**; il massimo scarto tollerato è di $\pm 1^{\circ}\text{C}$. Preriscaldare prima dell'uso HYB e STR a 37-45°C. I reattivi devono essere privi di precipitati (nota comunque che la soluzione CON-D è opaca). Se necessario, miscelarli. Portare tutti gli altri reattivi a temperatura ambiente, ad eccezione del CON-C e del SUB-C. Diluire 1:100 il coniugato concentrato (CON-C, arancione) e il substrato concentrato (SUB-C, giallo) nei rispettivi tamponi di diluizione (**CON-C con CON-D e SUB-C con SUB-D**) in base ai volumi richiesti. Miscelare bene e portare a temperatura ambiente. Per ogni striscia da testare, aggiungere 10 μl di reagente concentrato in 1 ml di tampone. Diluire CON-C ogni volta prima del test. Il SUB-C diluito è stabile per 4 settimane a temperatura ambiente e protetto dalla luce.

1. **Dispensare 20 μl di soluzione di denaturazione (DEN, blu) nell'angolo di ogni canale della vaschetta usato.**

2. **Aggiungere 20 μl di campione amplificato, miscelare bene col puntale e incubare per 5 minuti a temperatura ambiente.**

Nel frattempo estrarre con una pinzetta le strisce e numerarle con una matita al di sotto della marcatura colorata. Maneggiare le strisce sempre con i guanti.

3. **Aggiungere con attenzione 1 ml di Tampone di ibridazione (HYB, verde) preriscaldato in ogni canale utilizzato. Agitare gentilmente la vaschetta fino a rendere la soluzione omogeneamente colorata.**

Fare attenzione a non far traboccare il liquido nei canali vicini.

4. **Con le pinzette porre le strisce nei canali da utilizzare.**

Le strisce devono essere completamente immerse nella soluzione e con il lato su cui sono adese le sonde (identificabile dalla presenza di una marcatura colorata alla base della striscia) rivolto verso l'alto. Nel caso in cui la striscia si volti nel momento in cui è posta nel liquido, rimetterla nel giusto orientamento con le pinzette, che vanno poi accuratamente pulite per evitare contaminazioni. Questo procedimento si applica a tutti i passaggi seguenti.

5. **Porre la vaschetta su un agitatore all'interno di un bagno termostato/TwinCubator® e incubare per 30 minuti a 45°C.**

Regolare in modo appropriato la frequenza dell'agitatore per miscelare la soluzione in modo ottimale. Per assicurare un riscaldamento adeguato la vaschetta dovrebbe restare immersa per almeno 1/3 della sua altezza.

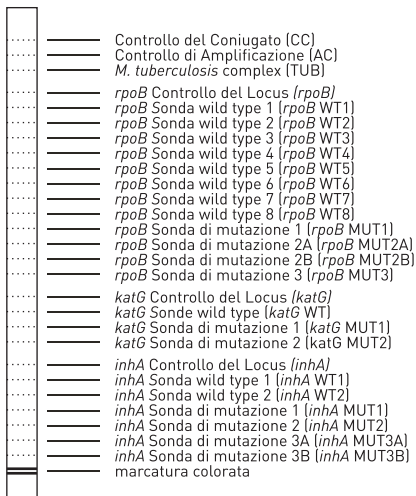
6. **Aspirare completamente il Tampone di ibridazione.**
Usare, ad esempio, una pipetta Pasteur o un puntale collegato a una pompa a vuoto.
7. **Aggiungere 1 ml di soluzione di lavaggio stringente (STR, rosso) ad ogni striscia e incubare per 15 minuti a 45°C sull'agitatore nel bagno termostato/TwinCubator®.**
8. **Da questo momento in poi si lavora a temperatura ambiente. Eliminare completamente il Tampone di lavaggio stringente.**
Eliminare il Tampone di lavaggio stringente prima rovesciando la vaschetta in un contenitore per i rifiuti e poi battendola gentilmente su carta assorbente. Questo procedimento si applica ad ogni fase di lavaggio.
9. **Lavare ogni striscia con 1 ml di soluzione di risciacquo (RIN) per 1 minuto su TwinCubator® o agitatore a temperatura ambiente. Eliminare poi la soluzione rovesciando la vaschetta.**
10. **Aggiungere 1 ml di coniugato diluito (vedi sopra) ad ogni striscia e incubare per 30 minuti su agitatore/TwinCubator® a temperatura ambiente.**
11. **Rimuovere la soluzione e lavare le strisce due volte per 1 minuto con 1 ml di soluzione di Risciacquo (RIN) e una volta per 1 minuto con 1 ml di acqua distillata su agitatore/TwinCubator® a temperatura ambiente.**
Assicurarsi di eliminare completamente l'acqua al termine dell'ultimo lavaggio.
12. **Aggiungere 1 ml di substrato diluito (vedi sopra) ad ogni striscia e incubare al buio senza agitare.**
Il tempo di incubazione può variare da 3 a 20 minuti in funzione delle condizioni ambientali (ad esempio la temperatura del locale). Un tempo di incubazione prolungato può portare ad un aumento della colorazione di fondo e interferire con l'interpretazione dei risultati.
13. **Fermare la reazione lavando con acqua distillata per due volte.**
14. **Utilizzando le pinzette rimuovere le strisce dalla vaschetta e lasciarle asciugare fra due strati di carta assorbente.**

Lettura e interpretazione dei risultati

Incollare le strisce e conservarle protette dalla luce. Nel kit è fornita una scheda di valutazione che può anche essere scaricata dal sito:

www.hain-lifescience.de/pdf/mtbdrplus_evaluation.pdf

Utilizzando questa scheda di valutazione, incollare le strisce nelle posizioni predefinite allineando le bande dei CC e AC con quelle di riferimento riportate sulla scheda stessa. Determinare lo stato di resistenza e annotarlo nelle rispettive colonne; come aiuto per l'interpretazione sono forniti nel capitolo seguente degli esempi di valutazione. Anche la mascherina di riferimento fornita nel kit serve come aiuto per la valutazione e deve essere allineata sulla scheda come le strisce dei campioni (allineare le bande CC e AC). Ogni striscia possiede un totale di 27 zone reattive (vedi figura).



Nota: La striscia non è visualizzata nel formato originale e non deve essere utilizzata per l'interpretazione.

Non tutte le bande positive di una striscia devono mostrare la stessa intensità.

Controllo del Coniugato (CC)

Lo sviluppo di questa banda sulla striscia conferma l'efficacia del legame del coniugato e della reazione del substrato.

Controllo di Amplificazione (AC)

Se il test viene eseguito correttamente, un amplicone di controllo si legherà alla zona di controllo di amplificazione. Se si sviluppa questa banda, possono essere esclusi errori nella messa a punto dell'estrazione e dell'amplificazione e il trascinarsi di inibitori dell'amplificazione. In caso di risultato positivo del test, la banda di Controllo di Amplificazione può risultare debole oppure non comparire del tutto. Questo può essere dovuto a una reazione di competizione durante l'amplificazione. In questo caso, la reazione di amplificazione è avvenuta comunque correttamente e il test non deve essere ripetuto.

La mancanza della banda AC in caso di risultato negativo del test indica errori nella messa a punto dell'amplificazione o trascinarsi di inibitori dell'amplificazione. In questo caso il test non è valido e il relativo campione deve essere ripetuto.

Complesso *M. tuberculosis* (TUB)

Questa banda, come noto, compare solo in presenza di amplificati ottenuti da tutti i membri del *Mycobacterium tuberculosis* complex. Se non compare la banda TUB, i batteri testati non appartengono al *M. tuberculosis* complex e non possono essere valutati con questo test.

Controlli del Locus (*rpoB*, *katG* e *inhA*)

Le bande di Controllo del Locus rilevano una regione genica specifica del rispettivo locus e devono sempre comparire.

Sonde Wild type

Le sonde wild type coprono le più importanti aree di resistenza dei rispettivi geni (vedi figura 1, tabelle 1, 2 e 3). Quando compaiono tutte le bande wild type di un gene, non è rilevabile nessuna mutazione all'interno delle regioni esaminate. Il ceppo testato risulta sensibile al rispettivo antibiotico.

In caso di mutazione, il rispettivo amplicone non si può legare alla corrispondente sonda wild type. Quindi, l'assenza di almeno una delle bande wild type indica resistenza del ceppo testato al rispettivo antibiotico.

Solo le bande che mostrano un'intensità simile o superiore a quella del Controllo di Amplificazione devono essere prese in considerazione.

Ogni pattern che differisce dal pattern wild type indica resistenza del ceppo testato. Il pattern di bande ottenuto con le sonde *rpoB* permette di trarre una conclusione riguardo la resistenza del ceppo testato alla rifampicina, il pattern di bande ottenuto con le sonde *katG* permette di trarre una conclusione riguardo la resistenza del ceppo testato ad alti livelli di isoniazide, il pattern di bande ottenuto con le sonde *inhA* permette di trarre una conclusione riguardo la resistenza del ceppo testato a bassi livelli di isoniazide, rispettivamente.

Sonde di mutazione

Le sonde di mutazione rilevano alcune delle più comuni mutazioni che causano resistenza (vedi tabelle 1, 2 e 3). Le bande delle sonde di mutazione *rpoB* MUT2A e MUT2B possono sviluppare una colorazione meno intensa rispetto alle altre sonde.

Solo le bande che mostrano un'intensità simile o superiore a quella del Controllo di Amplificazione devono essere prese in considerazione.

Ogni pattern che differisce dal pattern wild type indica resistenza del ceppo testato. Il pattern di bande ottenuto con le sonde *rpoB* permette di trarre una conclusione riguardo la resistenza del ceppo testato alla rifampicina, i patterns di bande ottenuti con le sonde *katG* e *inhA* permettono, rispettivamente, di trarre una conclusione riguardo ad alti e bassi livelli di resistenza all'isoniazide.

Fare attenzione ai seguenti casi:

1. C'è la possibilità che il campione testato contenga un ceppo eterogeneo. Se questo ceppo ha sviluppato solo una parziale resistenza, possono comparire sia le bande di mutazione, sia le corrispondenti bande wild type.
2. C'è la possibilità che il campione testato contenga più di un ceppo di *M. tuberculosis* (a causa di campioni misti o contaminazioni). Se almeno uno di questi ceppi contiene una mutazione possono comparire sia le bande di mutazione, sia le corrispondenti bande wild type.

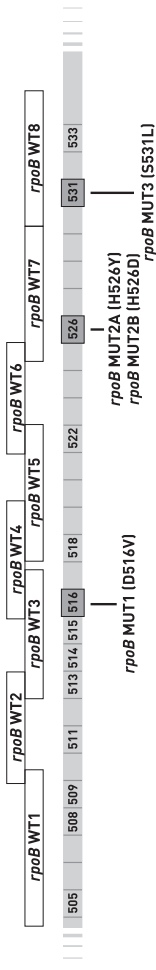


Figura 1: regione rifampicina resistenza del gene *rpoB*

rpoB WT1-8: sonde *rpoB* wild type, *rpoB* MUT1-3: sonde di mutazione *rpoB*. I numeri precisano la posizione degli amminoacidi (codoni) per tutte le mutazioni elencate in tabella. Sono state evidenziati i codoni su cui sono state disegnate le sonde di mutazione.

Tabella 1: Mutazioni nel gene *rpoB* e corrispondenti sonde wild type e di mutazione (modificate in accordo con Talenti et al. 1993, Lancet, 341: 647-650)

sonde wild type mancanti	codone analizzato	sonda di mutazione	mutazione
<i>rpoB</i> WT1	505-509		F505L
			T508A S509T
<i>rpoB</i> WT2	510-513		L511P*
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517		Q513L* Q513P del514-516
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<i>rpoB</i> MUT1	D516V D516Y del515
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522		del518* N518I
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>rpoB</i> WT7	526-529	<i>rpoB</i> MUT2A	H526Y
		<i>rpoB</i> MUT2B	H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<i>rpoB</i> MUT3	S531L S531P S531Q* S531W L533P

* Questa rara mutazione è stata per ora rilevata solo in modo teorico (*in silico*).
E' quindi possibile che la mutazione non possa essere rilevata *in vitro*.

Tabella 2: Mutazioni nel gene *katG* e corrispondenti sonde wild type e di mutazione

sonde wild type mancanti	codone analizzato	sonda di mutazione	mutazione
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1	S315T1
		<i>katG</i> MUT2	S315T2

Tabella 3: Mutazioni nella regione promotrice del gene *inhA* e corrispondenti sonde wild type e di mutazione

sonde wild type mancanti	acidi nucleici analizzati posizione	sonda di mutazione	mutazione
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T8A

Esempi di valutazione

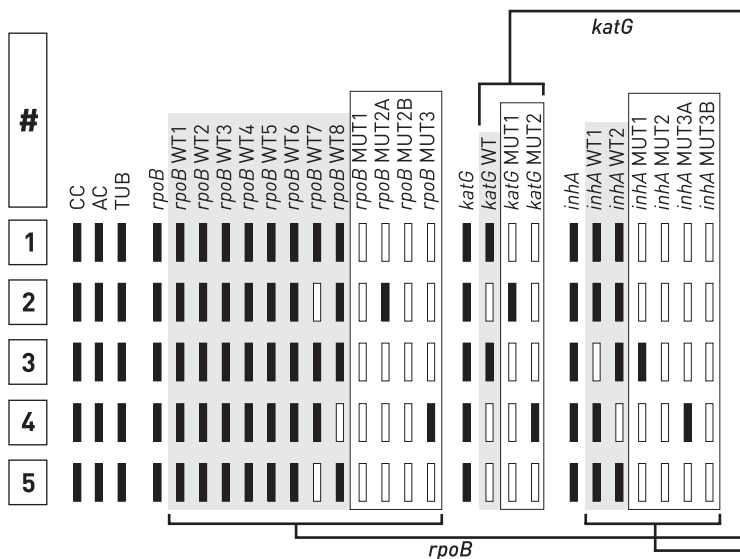


Figura 2: Esempi di pattern di bande e loro valutazione rispetto alla resistenza a rifampicina o all'isoniazide

Se si osserva la comparsa di tutte le bande wild type, questo è classificato come positivo e marcato nella colonna WT del rispettivo gene con "+". Se anche solo una delle bande wild type non compare, questo è classificato come negativo e marcato nella colonna WT del medesimo gene con "-". Nella colonna delle mutazioni si inserisce un segno negativo solo quando nessuna delle bande di mutazione mostra colorazione. Se anche solo una delle bande di mutazione mostra colorazione, questo è classificato come mutazione-positivo.

								RMP		INH	
TUB	<i>rpoB</i> WT	<i>rpoB</i> MUT	<i>katG</i> WT	<i>katG</i> MUT	<i>inhA</i> WT	<i>inhA</i> MUT		sensitive	resistant	sensitive	resistant
+	+	-	+	-	+	-	+			+	
+	-	+	-	+	+	-		+			+
+	+	-	+	-	-	+	+				+
+	-	+	-	+	-	+		+			+
+	-	-	-	-	+	-		+			+

inhA

L'esempio 1 mostra il pattern wild type. Compaiono tutte le bande wild type e non compare nessuna banda di mutazione; per questo la scheda di valutazione riporta "+" nelle tre colonne wild type a "-" nelle tre colonne di mutazione. Di conseguenza, gli spazi riservati a rifampicina (RMP) e isoniazide (INH) sono marcati come sensibili. Nell'esempio 5 mancano delle bande *rpoB* e *katG* wild type; per questo gli spazi per *rpoB* WT e *katG* WT sono marcati con "-". Anche nel caso in cui mancano tutte le bande di mutazione, questi spazi sono marcati con "-". La regione promotrice di *inhA* non differisce dal pattern wild type. Il ceppo viene quindi valutato come RMP e INH resistente. La resistenza a INH è causata da una mutazione nel gene *katG* ed è dunque un alto livello di resistenza all'isoniazide.

Limitazioni

Le dichiarazioni riportate in questo manuale d'uso riguardanti le potenzialità del metodo si riferiscono a campioni colturali e a campioni polmonari con microscopia positiva. I dati riguardanti campioni extrapolmonari con microscopia positiva non sono sufficienti per trarre conclusioni sulla loro applicabilità.

Come ogni sistema basato sull'analisi del DNA, questo test esamina solo la sequenza degli acidi nucleici e non la sequenza degli amminoacidi. E' possibile quindi che le mutazioni che non causano il cambiamento di un amminoacido (mutazioni silenziose) possano determinare l'assenza di segnale di una delle sonde wild type.

I dati più recenti indicano che un ceppo di *M. tuberculosis*, nonostante la mutazione L533P, possa essere comunque sensibile alla rifampicina. Quindi, se non compare la banda WT8 e non compare la banda rpoB MUT3, devono essere discussi i risultati della determinazione fenotipica della resistenza.

Negli ultimi anni sono state pubblicate nuove mutazioni all'interno della regione del gene rpoB che induce la resistenza alla rifampicina. Poiché queste sono mutazioni molto rare, non è stato possibile reperirle per la valutazione di questo sistema, ma sono state rilevate solo *in silico*. Tuttavia, le rilevazioni *in silico* non escludono la possibilità che alcune di queste mutazioni non possano essere rilevate *in vitro*.

Il test **GenoType® MTBDRplus** rileva solo le resistenze dei *M. tuberculosis* complex che hanno origine nelle regioni qui esaminate dei geni *rpoB*, *katG* e *inhA*. Con questo test non sono rilevabili le resistenze che hanno origine da mutazioni in altri geni o in altre regioni geniche o da ulteriori meccanismi di resistenza per rifampicina e isoniazide.

L'utilizzatore dovrebbe già possedere o acquisire informazioni riguardanti la distribuzione locale del pattern di mutazione dei geni studiati con questo test.

La presenza di più specie batteriche nel campione di partenza può complicare l'interpretazione del test.

Teoricamente, una resistenza può esistere nonostante un pattern di tipo wild type. Se il campione testato contiene un ceppo che ha sviluppato solo una parziale resistenza non coperta dalle sonde di mutazione, può comparire il pattern wild type. Se il campione contiene più di un ceppo di *M. tuberculosis* (a causa di campioni misti o contaminazioni) e uno di questi contiene una mutazione che non è coperta dalle sonde di mutazione, può comparire il pattern wild type. Come per altri test diagnostici, i risultati di questo test possono essere interpretati solo insieme ad altri risultati di laboratorio e a dati clinici resi disponibili dal responsabile medico.

Prima della fase di amplificazione il DNA deve essere isolato da colture batteriche o direttamente da campioni polmonari con microscopia positiva con un metodo appropriato. Assicurarsi che il DNA venga efficientemente amplificato durante la reazione di amplificazione.

Il test opera strettamente entro i limiti della regione genomica in cui sono state scelte le sonde. Un'eventuale analisi di sequenziamento può essere effettuata come test di completamento.

Come per ogni sistema di rilevazione basato su ibridazione genica esiste la possibilità che il test, in casi di variazioni nelle sequenze geniche dalle quali i primers e le sonde sono stati scelti e per le quali il test non è stato progettato, possa dare falsi risultati. Vista l'alta variabilità del genoma batterico è possibile che alcuni sottotipi batterici possano non essere rilevati. Il test riflette l'attuale stato di conoscenza di Hain Lifescience.

L'utilizzo di questo test è limitato a personale qualificato, ben addestrato sulla procedura del test e che conosce bene le tecniche di biologia molecolare.

Le valutazioni di questo test sono state eseguite utilizzando l'enzima HotStarTaq Polymerase fornito da Qiagen (Hilden, Germania).

Risoluzione dei problemi

Bande deboli o assenti (compreso il Controllo del Coniugato)

- Temperatura ambiente troppo bassa o reagenti non equilibrati alla temperatura del locale.
- Quantità nulla o insufficiente di CON-C e/o di SUB-C usati.

Bande deboli o assenti ad eccezione del Controllo del Coniugato

- La quantità e/o la qualità del DNA estratto non garantisce un'efficiente reazione di amplificazione. Verificare la presenza degli ampliconi su gel di agarosio al 2%. Se gli ampliconi non risultano visibili, ripetere la fase di estrazione e amplificazione del DNA. Se è il caso, utilizzare un altro metodo di estrazione (vedi capitolo Isolamento del DNA).
- La temperatura delle incubazioni è troppo elevata.

Colorazione non omogenea

- Le strisce non sono state completamente sommerse durante le fasi di incubazione.
- Le vaschette non sono state sufficientemente agitate.

Forte colorazione di fondo

- Il CON-C e/o il SUB-C usati troppo concentrati.
- I cicli di lavaggio non accuratamente eseguiti.
- La soluzione di lavaggio troppo fredda.

Risultati inattesi

- Temperatura di incubazione errata.
- Tampone di ibridazione e/o soluzione di lavaggio stringente non adeguatamente preriscaldati o miscelati.
- Contaminazione del DNA isolato e/o dei reattivi di amplificazione con DNA isolato e/o amplificato. Quando sono contaminati i reattivi di amplificazione, anche un eventuale controllo negativo (in cui è stata aggiunta solo acqua) mostra il relativo pattern di bande.
- Contaminazione dei canali adiacenti in seguito a schizzi durante l'aggiunta del Tampone di Ibridazione.

- Si può avere un rapido ed intenso sviluppo di una banda, che dipende dalla quantità di DNA amplificato e dalle specifiche condizioni in cui avviene la reazione. In tal caso, interrompere tempestivamente l'incubazione del substrato appena la banda diventa chiaramente visibile, per prevenire lo sviluppo di bande dovute a reazioni di cross-ibridazione.
- Coltura non pura come prodotto di partenza o più di una mutazione nel ceppo testato.
- Mutazione silente nella regione della sonda (consultare il capitolo Limitazioni).

Materiale richiesto ma non fornito

- Acqua distillata sterile, per biologia molecolare
- Agitatore/**TwinCubator®**
- Bagno termostatico provvisto di agitatore/**TwinCubator®**
- Carta assorbente
- Cilindri graduati
- DNA Polimerasi Termostabile con relativo tampone. Si raccomanda: tipo "Hot start"; capacità di estensione 2-4 kb/min a 72°C; tempo di emivita 10 min a 97°C e 60 min a 94°C; efficienza di amplificazione >10⁵ volte
- Guanti monouso
- Pinzette
- Pipette regolabili da 10, 20, 200, 1000 µl
- Provette per PCR, DNasi e RNasi free
- Puntali monouso sterili con filtro
- Reagenti per l'isolamento del DNA e relativa strumentazione
- Termociclatore automatico (velocità di riscaldamento 3°C/sec; velocità di raffreddamento 2°C/sec; precisione +/-0,2°C)
- Termometro calibrato
- Timer

Contenuto del kit

	Quantità	
Strisce coattate con sonde specifiche (STRIPS)	12	96
Mix di primers/nucleotidi (PNM) contiene primers biotinilati specifici, nucleotidi, <1% Dimetil-Solfossido, colorante	0,5 ml	4 ml
Soluzione di denaturazione (DEN) pronta all'uso contiene NaOH <2%, colorante	0,3 ml	2,4 ml
Tampone di ibridazione (HYB) pronto all'uso contiene tensioattivo anionico 8-10%, colorante	20 ml	120 ml
Soluzione di lavaggio stringente (STR) pronta all'uso contiene un composto ammoniacale quaternario >25%, tensioattivo anionico <1%, colorante	20 ml 1	20 ml
Soluzione di risciacquo (RIN) pronta all'uso contiene tampone, NaCl <1%, tensioattivo anionico <1%	50 ml	360 ml
Coniugato concentrato (CON-C) concentrato contiene streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina, colorante	0,2 ml	1,2 ml
Tampone di diluizione del coniugato (CON-D) contiene tampone, reagente bloccante 1%, NaCl <1%	20 ml	120 ml
Substrato concentrato (SUB-C) concentrato contiene Dimetil-Solfossido, complesso substrato	0,2 ml	1,2 ml
Tampone di diluizione del substrato (SUB-D) contiene tampone, MgCl ₂ <1%, NaCl <1%	20 ml	120 ml
Vaschetta, scheda di valutazione	1 cad.	4 cad.
Foglio di istruzioni, mascherina	1 cad.	1 cad.

Informazioni per gli Ordini

GenoLyse® per 96 ampioni

codice 51610

GenoType® MTBDRplus

Test de Genética Molecular para Identificación de Resistencia a Rifampicina y/o Isoniazida del complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Metodología

El kit **GenoType® MTBDRplus** está basado en la tecnología **DNA•STRIP®** y permite la identificación mediante genética molecular del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia a rifampicina y/o isoniazida, desde cultivo o material de paciente procedente de muestras pulmonares baciloscopia positivas. La identificación de la resistencia a rifampicina es posible gracias a la detección de las mutaciones más significativas del gen *rpoB* (que codifica por la subunidad β de la ARN polimerasa). Para testar la resistencia de isoniazida de alto nivel es examinado el gen *katG* (que codifica por la catalasa peroxidasa), y para testar la resistencia a isoniazida de bajo nivel, es examinada la región del promotor del gen *inhA* (que codifica por la NADH enoil ACP reductasa).

El procedimiento completo se divide en tres pasos: aislamiento de DNA procedente de cultivo (placas de cultivo/medio líquido) o de material directo (muestras pulmonares baciloscopia positivas decontaminadas) – los reactivos necesarios no se suministran – una amplificación múltiplex con primers marcados con biotina (la DNA polimerasa termoestable no se incluye), y una hibridación reversa.

La hibridación incluye los siguientes pasos: desnaturalización química del producto a amplificar, hibridación de amplicones en una sola cadena, marcados con biotina, a sondas unidas a membrana, lavado astringente, adición de conjugado de fosfatasa alcalina/streptavidina (AP), y una reacción de tinción mediada por AP. Una plantilla asegura la interpretación sencilla y rápida del esquema de bandas obtenido.

Almacenamiento y Precauciones

Almacene la mezcla del Primer/Nucleótido (PNM) a 2-8°C a su llegada aislándola de cualquier fuente potencial de DNA contaminante.

Si se requiere almacenamiento durante más de 4 semanas, almacene a -20°C. A fin de evitar congelaciones y descongelaciones repetidas, alicuote el PNM. Almacene el resto de los componentes del kit en 2-8°C. No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad.

Los especímenes de los pacientes y los cultivos realizados a partir de especímenes de pacientes deben ser considerados siempre como potencialmente infecciosos. Las muestras de pacientes de riesgo y los cultivos realizados a partir de esas muestras deben ser etiquetados y manejados siempre bajo las condiciones de seguridad adecuadas. Observe todas las normas medioambientales y de seguridad, tanto federales, estatales como locales. Lleve siempre guantes y ropa adecuados. El tratamiento y preparación de la muestra, incluyendo el paso de inactivación por calor, deben ser llevados a cabo en una cabina de seguridad de clase II. Antes del paso de inactivación por calor las muestras deben ser centrifugadas en un rotor con contenedor de aerosoles. Abrir el rotor con contenedor de aerosoles solamente en la cabina de seguridad. Después de la inactivación por calor se puede utilizar un rotor standard para centrifugar las muestras fuera de la cabina de seguridad. Observe las precauciones normales para preparar la amplificación. Es esencial que todos los materiales y reactivos usados para aislamiento de DNA y amplificación estén libres de DNasas.

Cuando manipule los reactivos del kit debe tomar las siguientes medidas especiales de seguridad:

La **Solución de Desnaturalización** (DEN) contiene <2% de NaOH y es irritante para ojos y piel (R 36/38 y S 26-37/39-45).

El **Sustrato Concentrado** (SUB-C) contiene Dimetil Sulfóxido y es irritante (R 36/37/38, S 23-26-36).

Para información adicional, consulte las fichas de seguridad del material. También puede descargarse de: www.hain-lifescience.com/products/msds.html

Control de Calidad

A fin de validar el funcionamiento correcto del test y la funcionalidad de los reactivos, cada tira incluye 5 zonas de control:

- una zona de Control de Conjugado para comprobar la unión del conjugado a la banda y una reacción cromogénica correcta
- una zona de Control de Amplificación para comprobar la amplificación correcta de la reacción.
- tres zonas de control (*rpoB*, *katG* y *inhA*) para comprobar la sensibilidad óptima de la reacción de cada loci testado

Aislamiento de DNA

Puede usarse un crecimiento bacteriano en placas de cultivo (ej.: Loewenstein-Jensen, Middlebrook), o en medio líquido (ej.: BACTEC, MB-Check), así como, material directo de baciloscopias positivas (muestras pulmonares). Este test no puede usarse para detectar mycobacteria directamente de muestras de pacientes con baciloscopias negativas. La zona de trabajo ha de estar libre de DNA amplificado. Es crucial el calentamiento de las muestras a 95°C durante, al menos, 20 minutos con objeto de inactivar bacterias vegetativas. Se puede seguir cualquier procedimiento de aislamiento de DNA que produzca DNA de bacterias amplificable. El siguiente protocolo rápido normalmente produce DNA adecuado para amplificación:

- 1a. Cuando use crecimiento bacteriano en medio sólido, recoja bacterias con un asa de inoculación y suspéndalas en aproximadamente 300 µl de agua [grado Biología Molecular].
- 1b. Cuando use crecimiento bacteriano procedente de medio líquido, aplique directamente 1 ml. Cuando use material directo de paciente, aplique 500µl de muestra decontaminada*. Concentre las bacterias mediante centrifugación 15 min en una centrífuga de sobremesa en un rotor con contenedor de aerosoles y en una cabina de seguridad de clase II a 10000 x g aproximadamente. Deseche el sobrenadante y resuspenda las bacterias en 100-300 µl de agua (para muestras de cultivos), o 100 µl de agua (para material directo de pacientes) agitando con un vortex.
2. Incube las bacterias procedentes del apartado 1a o 1b durante 20 min a 95°C en un baño de agua.
3. Incube durante 15 min en un baño de ultrasonidos.
4. Centrifugue durante 5 min a máxima velocidad y utilice directamente 5 µl del sobrenadante para la PCR. En caso de que la solución de DNA haya de almacenarse por períodos prolongados de tiempo, transfiera el sobrenadante a un tubo nuevo.

* Las muestras deben procesarse utilizando el método "NALC/NaOH" según la publicación de la CDC "Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory".

Se pueden obtener protocolos más detallados a través de su distribuidor local o en la dirección: www.hain-lifescience.de/pdf/dnaisol_myco.pdf

El ensayo ha sido validado también con el kit **GenoLyse®** (ver capítulo de Información Para Pedidos) el cual puede ser utilizado alternativamente para el aislamiento de ADN a partir de muestra directa. Para instrucciones de uso, por favor remítase al manual del kit **GenoLyse®** kit.

Amplificación

Prepare la mezcla de amplificación (45 µl) en una habitación libre de DNA. La muestra debe añadirse en un área separada.

Mezcle por tubo:

- 35 µl de PNM
- 5 µl 10x de tampón para incubación de polimerasa – no suministrado.
- x µl de solución $MgCl_2$ ¹⁾ – no suministrado
- 1-2 unidades de DNA polimerasa termoestable (consulte el manual) – no suministrado
- y µl de agua para obtener un volumen de 45 µl (sin considerar el volumen de enzima) – no suministrado.
- Añada 5 µl de solución de DNA (20-100 ng de DNA) para obtener un volumen final de 50 µl (sin considerar el volumen de enzima).

¹⁾ Dependiendo del sistema enzima/tampón usado, la concentración óptima de $MgCl_2$ puede variar entre 1,5 y 2,5 mM. Tenga en cuenta que algunos tampones para incubación ya contienen $MgCl_2$.

Determine el número de muestras a amplificar (número de muestras a analizar más las muestras de control). Por ejemplo, un control negativo contiene 5 µl de agua en lugar de solución de DNA. Prepare una mezcla que contenga todos los reactivos excepto la solución de DNA y mezcle bien. No utilice vortex. Alicuote la mezcla madre en volúmenes de 45 µl en tubos preparados de PCR.

Perfil de amplificación:

	muestras de cultivos	material directo de paciente
5 min ²⁾ 95°C	1 ciclo	1 ciclo
30 seg 95°C 2 min 58°C	10 ciclos	10 ciclos
25 seg 95°C 40 seg 53°C 40 seg 70°C	20 ciclos	30 ciclos
8 min 70°C	1 ciclo	1 ciclo

²⁾ Cuando se usen ciertas DNA polimerasas hot start, este paso ha de ser alargado (consulte el manual de la enzima).

Los productos para amplificación pueden almacenarse entre +4 y -20°C.

Para comprobar la reacción de amplificación, aplique directamente 5 µl de cada muestra a un gel de agarosa al 2% sin la adición de tampón de carga. Los amplicones producidos tienen una longitud aproximada de 63 pb (Control de Amplificación), 115 bp (*M. tuberculosis* complex), 166 pb (*rpoB*), 120 pb (*katG*) y 110 (*inhA*), respectivamente.

Hibridación

Preparación

Precaliente en baño de agua con agitación o **TwinCubator®** a **45°C**; la máxima desviación tolerada en la temperatura idónea es de $\pm 1^{\circ}\text{C}$. Precaliente las soluciones HYB y STR a 37-45°C antes de usar. Los reactivos han de estar libres de precipitado (tenga en cuenta, no obstante que la solución CON-D es opaca). Mezcle si fuera necesario. Caliente a temperatura ambiente los restantes reactivos, con la excepción del CON-C y el SUB-C. Usando un tubo adecuado, diluya el Conjugado Concentrado (CON-C, naranja) y el Sustrato Concentrado (SUB-C, amarillo) 1:100 con sus tampones respectivos (**CON-C con CON-D, SUB-C con SUB-D**) en las cantidades necesarias. Mezcle bien y equilibre a temperatura ambiente. Para cada tira añada 10 μl de concentrado a 1 ml de los respectivos tampones. Diluya el CON-C antes de cada uso. El SUB-C diluido es estable durante 4 semanas si se almacena a temperatura ambiente y se protege de la luz.

1. **Dispense 20 μl de la Solución de Desnaturalización (DEN, azul) en una esquina de cada uno de los pocillos usados.**
2. **Añada a la solución 20 μl de muestra amplificada, pipetee arriba y abajo para mezclar bien e incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.**

Entretanto, saque tiras de sus tubos usando pinzas e identifíquelas marcando bajo el marcador coloreado con un lápiz. Lleve siempre guantes cuando manipule tiras.

3. **Añada cuidadosamente a cada pocillo 1 ml de Tampón de Hibridación (HYB, verde) precalentado. Agite suavemente la bandeja hasta que la solución tenga un color homogéneo.**

Tenga la precaución de no derramar solución en los pocillos cercanos.

4. **Ponga una tira en cada pocillo.**

Las tiras tienen que quedar completamente cubiertas por la solución y el lado con la sonda hacia arriba (identificable por el marcador coloreado próximo al extremo inferior). Usando pinzas, de la vuelta a las tiras que pudieran haberse girado durante su inmersión. Limpie cuidadosamente las pinzas después de cada uso para evitar contaminación. Ello, es también de aplicación en los pasos siguientes.

5. **Ponga la bandeja en el baño de agua con agitación o en el TwinCubator® durante 30 minutos a 45°C.**

Ajuste la frecuencia de agitación del baño de agua para que realice una mezcla completa y constante de la solución. Para obtener una adecuada transferencia de calor, la bandeja debe estar sumergida en el agua, al menos, 1/3 de su altura.

6. **Aspire completamente el Tampón de Hibridación.**

Por ejemplo, use una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío.

7. **Añada 1 ml de Solución de Lavado Astringente (STR, roja) a cada tira e incube durante 15 minutos a 45°C en un baño con agitación o TwinCubator®.**

8. **Desde este paso, en adelante, trabaje a temperatura ambiente.**

Elimine completamente la Solución de Lavado Astringente .

Deseche la Solución de Lavado en un contenedor y elimine todo el líquido restante volcando la bandeja y golpeándola suavemente sobre un papel absorbente. Ello es también de aplicación a todos los demás pasos de lavado.

9. **Lave una vez cada tira con 1 ml de Solución de Aclarado (RIN) sobre la plataforma de agitado del TwinCubator® (elimine el RIN después de la incubación).**

10. **Añada 1 ml de Conjugado diluido (ver más arriba) a cada tira e incube durante 30 minutos sobre la plataforma de agitado del TwinCubator®.**

11. **Elimine la solución y lave cada tira dos veces durante 1 minuto con 1 ml de Solución de Aclarado (RIN) y de nuevo durante 1 minuto aproximadamente con 1 ml de agua destilada (ej.: botella de lavado) sobre la plataforma de agitación del TwinCubator® (deseche la solución cada vez).**

Asegúrese de eliminar cualquier resto de agua después del lavado anterior.

12. **Añada 1 ml de sustrato diluido (ver más arriba) a cada tira e incube sin agitación y protegiéndolas de la luz.**

Dependiendo de las condiciones del test (por ej. la temperatura ambiente), el tiempo de incubación del sustrato puede variar entre 3 y 20 minutos. Tiempos prolongados de incubación del sustrato pueden conducir a una tinción incrementada del fondo y podría dificultar la interpretación de los resultados.

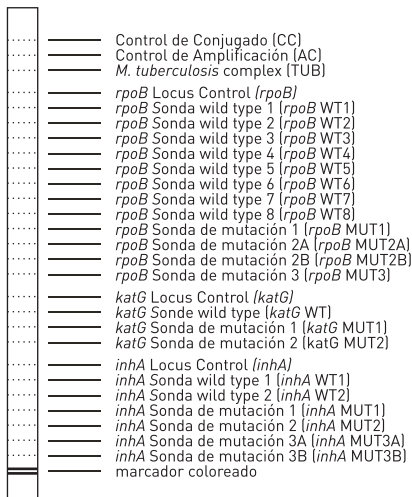
13. **Detenga la reacción aclarando brevemente por dos veces con agua destilada.**

14. **Usando pinzas, saque las tiras de la bandeja y séquelas entre dos capas de papel absorbente.**

Evaluación e Interpretación de Resultados

Pegue las tiras y almacénelas protegidas de la luz. Con cada kit se proporciona un formulario de evaluación. También puede descargarse de:

www.hain-lifescience.de/pdf/mtbdrplus_evaluation.pdf. Cuando se utilice este formulario de evaluación, pegue las tiras reveladas en los campos marcados, alineando las bandas CC y AC con las respectivas líneas del formulario. Determine el estado de la resistencia y anote en las respectivas columnas; como ayuda para la interpretación se dan ejemplos de evaluaciones en el siguiente apartado. La plantilla suministrada también sirve como ayuda para evaluación y ha de ser alineada con las bandas AC y CC de la tira. Cada tira tiene un total de 27 zonas de reacción (ver esquema).



Nota: La tira no se muestra a tamaño original y no debe ser usada para propósitos de interpretación.

No todas las bandas de una tira muestran la misma intensidad.

Control de Conjugado (CC)

Debe aparecer una línea en esta zona, documentando la eficacia del conjugado unido y la reacción del sustrato.

Control de Amplificación (AC)

Cuando el ensayo se realiza correctamente, un amplicón control se unirá a la zona del Control de Amplificación. Si este banda se desarrolla, se pueden excluir errores durante los procesos de extracción y amplificación, además de inhibidores de la amplificación. En caso de un resultado positivo del ensayo, la señal del Control de Amplificación puede ser débil e incluso puede llegar a desaparecer completamente. Esto puede ser debido a reacciones de competencia durante la amplificación. Sin embargo, en este caso, la reacción de amplificación se realizó correctamente y el ensayo no ha de ser repetido.

La ausencia de señal, en la banda AC en caso de un ensayo negativo, indica errores durante la amplificación o muestra con inhibidores de amplificación. En este caso, el ensayo no es válido y la muestra respectiva ha de ser repetida.

***M. tuberculosis* complex (TUB)**

Esta zona híbrida, como es conocido, con amplicones generados de todos los miembros conocidos de *Mycobacterium tuberculosis* complex. Si la zona TUB es negativa, la bacteria testada no pertenece al complejo *M. tuberculosis* y no puede ser evaluada mediante este sistema.

Locus Control (*rpoB*, *katG*, y *inhA*)

Las zonas del locus control detectan una región del gen específica para cada respectivo locus y siempre han de ser positivas.

Sondas Wild type

Las sondas wild type comprenden las áreas de resistencia más importantes de los genes respectivos (ver figura 1, tabla 1, 2 y 3) Cuando todas las sondas Wild type de un gen son positivas, no se detectan mutaciones en las regiones examinadas. La cepa testada es sensible para el respectivo antibiótico.

En caso de una mutación, el respectivo amplicón no puede unirse a la correspondiente sonda Wild type. La ausencia de señal en al menos una de las sondas Wild type indica, por tanto, resistencia de la cepa testada al respectivo antibiótico.

Solamente serán consideradas como positivas aquellas bandas cuya intensidad sea igual o mayor que la banda de control de amplificación.

Cada patrón que se desvíe del patrón wild type indica resistencia de la cepa testada. El patrón de bandas obtenido con las sondas *rpoB* permite dibujar una conclusión sobre la resistencia a rifampicina de las cepas testadas, el patrón de bandas obtenido con las sondas *katG* permite dibujar una conclusión sobre las resistencias de alto nivel a isoniazida, el patrón de bandas obtenido con las sondas *inhA* permiten dibujar una conclusión sobre las resistencias de bajo nivel a isoniazida de las cepas testadas, respectivamente.

Sondas de mutación

Las sondas de mutación detectan algunas de las resistencias más comunes medidas por mutaciones (ver 1, 2 y 3). Comparadas con otras muestras, las señales positivas de las sondas de mutación *rpoB* MUT2A y MUT2B pueden mostrar una señal más débil.

Solamente deben ser consideradas aquellas bandas cuya intensidad es de la misma intensidad o mayor que las del Control de Amplificación.

Cada patrón que se desvíe del patrón del wild type indica resistencia de la cepa testada. El patrón de bandas obtenido con la sonda *rpoB* permite dibujar una conclusión sobre la resistencia a rifampicina de la cepa testada, el patrón de bandas del *katG* sobre un nivel alto y el patrón de bandas del *inhA* sobre una nivel bajo de resistencia a isoniazida respectivamente.

Atención a los siguientes casos especiales:

1. Existe la posibilidad de que el espécimen testado contenga una cepa heterogénea. Si, en la investigación, esta cepa ha desarrollado solo una resistencia parcial, pueden aparecer una de las sondas de mutación, así como la sonda wild type correspondiente.
2. Existe la posibilidad de que el espécimen testado contenga más de una cepa de *M. tuberculosis* (debido a un cultivo mixto o una contaminación). Si, al menos, una de estas cepas contiene una mutación, una de las sondas de mutación, así como su correspondiente sonda wild type, pueden aparecer.

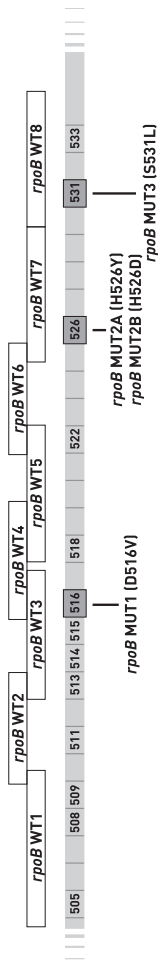


Figura 1: Regiones de resistencia a rifampicina del gen *rpoB*,

rpoB WT1-8: sonda *rpoB* wild type; *rpoB* MUT1-3: sonda de mutación *rpoB*.

Los números especifican las posiciones de los aminoácidos (codones) para todas las mutaciones listadas en la tabla. Los codones que fueron designados para cada sonda de mutación están remarcados.

Tabla 1: Mutaciones en el gen *rpoB* y su correspondiente wild type y sondas de mutación (modificado de acuerdo con Telenti et al. 1993, Lancet, 341: 647-650)

Ausencia de sonda(s) wild type	Codon analizado	Sonda de mutación	Mutación
<i>rpoB</i> WT1	505-509		F505L
			T508A S509T
<i>rpoB</i> WT2	510-513		L511P*
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517		Q513L* Q513P del514-516
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<i>rpoB</i> MUT1	D516V D516Y del515
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522		del518* N518I
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>rpoB</i> WT7	526-529	<i>rpoB</i> MUT2A	H526Y
		<i>rpoB</i> MUT2B	H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<i>rpoB</i> MUT3	S531L S531P S531Q* S531W L533P

* Esta mutación rara ha sido detectada sólo teóricamente (*in silico*) hasta ahora. Es por tanto posible que la mutación no pueda ser detectada *in vitro*.

Tabla 2: Mutaciones en el gen *katG* y sus correspondientes sondas wild type y de mutación.

Ausencia de sonda(s) wild type	Codon analizado	Sonda de mutación	Mutación
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1	S315T1
		<i>katG</i> MUT2	S315T2

Tabla 3: Mutaciones en la region promotora de *inhA* y sus correspondientes sondas wild type y de mutación.

Ausencia de sonda(s) wild type	Acido nucleico analizado posición	Sonda de mutación	Mutación
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T8A

Ejemplos de evaluación

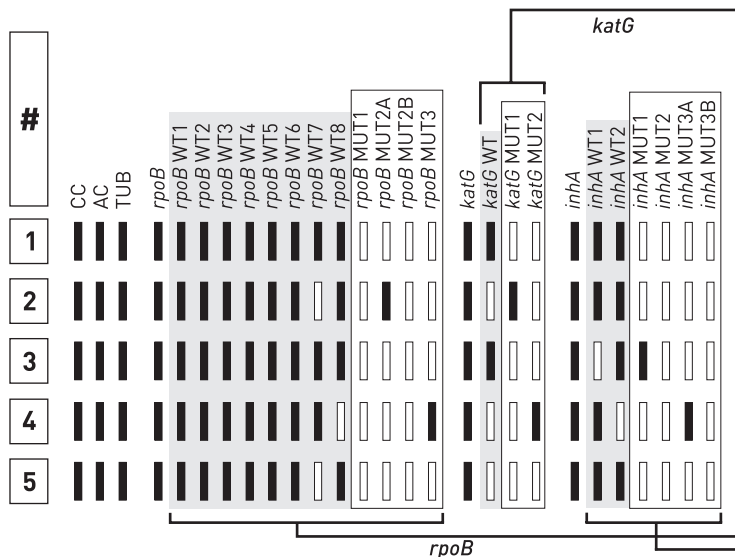


Figura 2: Ejemplos para modelos de bandeo y su evaluación con respecto a la resistencia a rifampicina y/o isoniazida

Si todas las bandas wild type muestra señal, este resultado es clasificado como positivo y marcaremos la columna de WT de los respectivos genes con el signo "+". Si la menos una de las bandas de Wild type está ausente, este resultado es clasificado como negativo y marcaremos la columna de WT de los mismos genes con "-".

Las columnas de mutación solamente se marcarán con un signo negativo cuando no aparezca ninguna de las bandas correspondientes a las mutaciones. Si al menos una de las bandas de mutación aparece positiva, este resultado se clasificará como mutación positiva.

TUB	<i>rpoB</i> WT	<i>rpoB</i> MUT	<i>katG</i> WT	<i>katG</i> MUT	<i>inhA</i> WT	<i>inhA</i> MUT	RMP		INH	
							sensitive	resistant	sensitive	resistant
+	+	-	+	-	+	-	+		+	
+	-	+	-	+	+	-		+		+
+	+	-	+	-	-	+	+			+
+	-	+	-	+	-	+		+		+
+	-	-	-	-	+	-		+		+

inhA

El ejemplo 1 muestra el patrón de bandas del wild type. Todas las sondas de Wild type muestran señal, pero ninguna de las sondas de mutación lo hacen, por tanto, la tarjeta de evaluación tiene un “+” en las tres columnas del wild type y un “-” en las tres columnas de las mutaciones.

De acuerdo a estos datos, las casillas para rifampicina (RMP) e isoniazida (INH) se marcarán como sensibles.

Un de las sondas de *rpoB* y de *katG* wild type están ausentes en el ejemplo 5; por tanto en las casillas de *rpoB* WT y *katG* WT se marcará “-”. Ya que ninguna de las sondas de mutación son positivas, estas casillas se marcarán también con “-”. La región promotora de *inhA* no se desvía del patrón wild type. La cepa es evaluada como RMP y INH resistente. La resistencia a INH está causada por una mutación en el gen *katG* y es por tanto una resistencia a isoniazida de alto nivel.

Limitaciones

La declaración dada en este manual con respecto a la capacidad del método, se refiere a muestras de cultivos y material directo de paciente de muestras pulmonares baciloscopia positivas. Los datos de cualquier muestra de material extrapulmonar baciloscopia positivo no es suficiente para trazar una conclusión acerca de su aplicabilidad.

Como en cualquier análisis basado en DNA, este test solamente analiza la secuencia de ácidos nucleicos y no la de aminoácidos. Es posible, por tanto, que mutaciones que no causan un cambio de aminoácido (mutaciones silenciosas) podrían producir la ausencia de una de las sondas wild type.

Los datos más recientes indican que a pesar de aparezca una mutación L533P en la respectiva cepa, esta puede todavía ser sensible a RMP. Por tanto, si la banda WT8 está ausente y la sonda de la mutación *rpoB* MUT3 no se tiñe, deben ser considerados los resultados de la resistencia fenotípica.

En los últimos años han sido publicadas mutaciones adicionales dentro de las testadas en la región del gen *rpoB* causantes de la resistencia a rifampicina. Ya que estas mutaciones son muy raras, estas no fueron accesibles para la validación de este sistema y fueron solamente detectadas *in silico*. Sin embargo, una detección *in silico* no excluye la posibilidad de que alguna de las mutaciones no pueda ser detectada *in vitro*.

El **GenoType® MTBDRplus** solamente detecta aquellas resistencias del *M. tuberculosis* complex que tienen sus orígenes en la regiones de *rpoB*, *katG* e *inhA* examinadas aquí. Resistencias que tienen sus orígenes en mutaciones en otros genes o regiones de genes, así como, otras resistencias o mecanismos de resistencia rifampicina e isoniazida no serán detectados por este test.

El usuario debe tener o adquirir información sobre el patrón de distribución de las mutaciones locales de los genes investigados con este test.

La presencia de múltiples especies de bacterias en la muestra a analizar puede dificultar la interpretación de resultados.

Teóricamente, puede existir resistencia a pesar de que aparezca un modelo wild type. Si, en un ensayo, la muestra contiene una cepa que ha desarrollado solamente una resistencia parcial que no está cubierta por las sondas de mutación, aparecerá el patrón de bandas de wild type. Si la muestra contienen más de una cepa de *M. tuberculosis* (debido a un cultivo mixto o una contaminación) y una de ellas alberga una mutación que no está cubierta por las sondas de mutación, aparecerá el patrón de bandas de wild type. Como en el caso de otras pruebas de diagnóstico, los

resultados de este ensayo sólo pueden interpretarse en conjunción con otros datos clínicos y de laboratorio adicionales a disposición del facultativo responsable.

Antes de la amplificación, el DNA ha de ser aislado de cultivo bacteriano o material de paciente procedente de muestras pulmonares baciloscopia positivas realizado por un método idóneo. Ha de tenerse la seguridad de que la muestra de DNA ha sido amplificada eficientemente durante la reacción de amplificación.

El test solo funciona dentro de los límites de regiones genómicas para las que las sondas han sido elegidas. El análisis de secuencias potenciales permanece reservado para la reanudación de investigaciones.

Como cualquier sistema de detección basado en la hibridación, este sistema contempla la posibilidad de que variaciones de las secuencias en las regiones genómicas que fueron elegidas para las primers y sondas, y la detección de regiones para las cuales el kit no fue diseñado, pueden conducir a resultados falsos. Debido a la gran variabilidad existente en los genomas bacterianos es posible que ciertos sub-tipos puedan no ser detectados. El test refleja los conocimientos de Hain Lifescience.

La utilización de este ensayo está limitada a personas cualificadas, bien entrenadas en el procedimiento de utilización del ensayo y familiarizadas con métodos de biología molecular.

La evaluación de este sistema de análisis fue llevada acabo utilizando la HotStarTaq polimerasa de Qiagen (Hilden, Alemania).

Anomalías

Todas la señales son débiles o no hay señales (incluyendo la zona de Control de Conjugado)

- Temperatura ambiente demasiado baja o reactivos no equilibrados a temperatura ambiente.
- Se ha usado muy poco, o nada, de CON-C y/o SUB-C.

Ausencia de señales, o señales débiles, excepto en la zona de Control de Conjugado

- La cantidad y/o la calidad del DNA aislado no permite una amplificación eficiente. Compruebe el amplicón en un 2% de gel de agarosa. En caso de que no haya amplicón visible, repita el aislamiento y amplificación de DNA. Si fuese necesario, pruebe un método diferente de aislamiento de DNA (ver sección Aislamiento de DNA).
- Temperatura de incubación demasiado alta. Tinción no homogénea
- Tiras no sumergidas por completo durante los pasos de incubación.
- Bandeja no agitada adecuadamente.

Fuerte color de fondo

- CON-C y/o SUB-B se han usado demasiado concentrados.
- Los pasos de lavado no fueron realizados con el cuidado necesario.
- Soluciones de lavado demasiado frías.

Resultado inesperado

- Temperatura de incubación incorrecta.
- El Tampón de Hibridación y/o la Solución de Lavado Astringente no se ha precalentado o mezclado adecuadamente.
- Contaminación de DNA aislado y/o agentes de amplificación con DNA aislado y/o amplificado. Cuando los reactivos de amplificación están contaminados, una muestra para control negativo también mostrará las correspondientes bandas.
- Contaminación de pocillos adyacentes debido a derrame durante la adición del Tampón de Hibridación.
- Dependiendo de la cantidad de DNA usado, y dependiendo de las condiciones específicas de la reacción, puede producirse un desarrollo fuerte y rápido de color. En tales casos interrumpa la incubación del sustrato tan pronto como las señales sean claramente visibles a fin de evitar bandas de hibridación cruzada.

- Un cultivo no puro como material de partida o más de una mutación en la cepa testada.
- Mutación silenciosa en la región de la sonda (ver capítulo Limitaciones).

Materiales Requeridos pero no Suministrados

- Agua destilada
- Baño de agua con agitación/**TwinCubator®**
- Cronómetro
- DNA polimerasa termoestable con buffer (recomendación: enzima hot start, rango de extensión: 2-4 kb/min a 72°C, vida-media 10 min a 97°C, 60 min a 94°C, eficiencia de amplificación >10⁵ doble)
- Guantes desechables
- Papel absorbente
- Pinzas
- Pipetas ajustables de 10, 20, 200, 1000 µl
- Plataforma de agitación/**TwinCubator®**
- Probeta graduada
- Puntas de pipeta desechables con filtro
- Reactivos para aislamiento de DNA, así como equipos necesarios
- Termociclador (rango de calentamiento 3°C/seg., rango de enfriamiento 2°C/seg., precisión +/-0,2°C)
- Termómetro calibrado
- Tubos para PCR, libres de DNasa y RNasa

Contenido del Kit

	Suministrado	
Tiras de membranas recubiertas con sondas específicas	12	96
Mezcla del Primer/Nucleótido (PNM) contiene primers específicos, nucleótidos, <1% Dimetil Sulfóxido, colorante	0,5 ml	4 ml
Solución de Desnaturalización (DEN) lista para usar contiene <2% NaOH, colorante	0,3 ml	2,4 ml
Tampón de Hibridación (HYB) listo para usar contiene tenso-aniónico al 8-10%, colorante	20 ml	120 ml
Solución de Lavado Astringente (STR) lista para usar contiene compuesto cuaternario de amonio al >25%, tenso-aniónico al <1%, colorante	20 ml	120 ml
Solución de Aclarado (RIN) lista para usar contiene tampón, <1% NaCl, tenso aniónico al <1%	50 ml	360 ml
Concentrado de Conjugado (CON-C) concentrado contiene fosfatasa alcalina conjugada con streptavidina, colorante	0,2 ml	1,2 ml
Tampón Conjugado (CON-D) contiene tampón, reactivo de bloqueo al 1%, <1% NaCl	20 ml	120 ml
Concentrado de Sustrato (SUB-C) concentrado contiene Dimetil Sulfóxido, solución sustrato	0,2 ml	1,2 ml
Tampón Sustrato (SUB-D) contiene tampón, <1% MgCl ₂ , <1% NaCl	20 ml	120 ml
Bandeja, formulario de evaluación	1 de cada	4 de cada
Manual de instrucciones, tablas	1 de cada	1 de cada

Información Para Pedidos

GenoLyse® para 96 muestras

código nº 51610

GenoType® MTBDRplus

Teste de Genética Molecular para a Identificação da Resistência à Rifampicina e/ou Isoniazida do complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Metodologia

O teste **GenoType® MTBDRplus** é baseado na tecnologia **DNA•STRIP®** e permite a identificação genética do complexo *M. tuberculosis* e da resistência à rifampicina e/ou isoniazida a partir de amostras cultivadas ou directamente de material pulmonar do paciente com microscopia positiva. A identificação da resistência à rifampicina é facultada pela detecção das mutações mais significativas do gene *rpoB* (que codifica a subunidade β da RNA polimerase). Para testar o nível elevado de resistência à isoniazida é examinado o gene *katG* (que codifica a catalase peroxidase), e para testar o nível baixo de resistência à isoniazida é examinada a região promotora do gene *inhA* (que codifica o NADH-enoil-ACP-redutase).

O procedimento completo é dividido em 3 passos: extracção do ADN a partir de material cultivado (placas de cultura/meio líquido) ou directamente de material (pulmonar, microscopia positiva, descontaminado) – os reagentes necessários não são fornecidos, uma amplificação multiplex com primers biotinilados (a ADN polimerase termoestável não é fornecida), e uma hibridização reversa.

A hibridização inclui os seguintes passos: desnaturação química dos produtos de amplificação, hibridização dos amplicons, em cadeia única e marcados com biotina, a sondas ligadas à membrana, lavagem adstringente, adição de um conjugado de streptavidina/fosfatase alcalina (AP), e uma reacção com produção de cor mediada pela AP. Um modelo assegura uma interpretação fácil e rápida do padrão de bandas obtido.

Armazenamento e Precauções

Após a chegada do kit, armazene a mistura Primer/Nucleótido (PNM) a 2-8°C, isolada de qualquer potencial fonte de ADN contaminante. Se for necessário um armazenamento longo (mais de 4 semanas), armazene a -20°C. Por forma a evitar ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, faça alíquotas da PNM. Armazene todos os restantes componentes do kit a 2-8°C. Não use os reagentes para além do seu prazo de validade.

Os espécimes de pacientes e as culturas feitas a partir de espécimes de pacientes devem ser sempre considerados como potencialmente infecciosos. As amostras de pacientes de risco e as culturas feitas a partir dessas amostras devem ser sempre rotuladas e manuseadas sob condições adequadas de segurança. Observe todos os regulamentos ambientais e de segurança federais, estaduais e locais. Use sempre luvas e roupa protectora apropriada. O tratamento dos espécimes e a preparação das amostras até, e inclusive o passo de inactivação por calor deve ser realizado numa câmara de segurança classe II. As amostras, antes dos passos de inactivação por calor, devem ser centrifugadas num rotor estanque a aerossóis. Este rotor só deve ser aberto na câmara de segurança. Após os passos de inactivação por calor as amostras podem ser centrifugadas, fora da câmara de segurança, num rotor standard. Observe as precauções habituais para preparar a amplificação. É essencial que todos os reagentes e todos os materiais usados para a extracção de ADN e para a preparação da amplificação estejam livres de DNases.

Ao manusear os reagentes do kit, devem ser aplicadas as seguintes medidas especiais de segurança:

A **Solução de Desnaturação** (DEN) contém <2% NaOH e é irritante para os olhos e para a pele (R 36/38 e S 26-37/39-45).

O **Substrato Concentrado** (SUB-C) contém Dimetil Sulfoxido e é irritante (R 36/37/38, S 23-26-36).

Para informação adicional, por favor consulte a ficha de dados de segurança dos materiais, podendo também obter-se por download a partir da morada:
www.hain-lifescience.com/products/msds.html

Controlo da Qualidade

Por forma a validar o desempenho correcto do teste e o funcionamento apropriado dos reagentes, cada tira inclui 5 zonas de controlo:

- uma zona de Controlo do Conjugado, conferindo a ligação do conjugado na tira e uma reacção cromogénica correcta
- uma zona de Controlo de Amplificação para verificar a reacção de amplificação.
- três zonas de Controlo de Loci (*rpoB*, *katG* e *inhA*) para verificar a sensibilidade óptima da reacção para cada um dos Loci dos genes testados.

Extracção de ADN

Podem ser usadas bactérias cultivadas em placas de cultura (ex. Loewenstein-Jensen, Middlebrook) ou em meio líquido (ex. BACTEC, MB-Check) pode ser usado também, directamente material com microscopia positiva (amostras pulmonares). O teste não pode ser usado para detectar micobactérias directamente a partir de material do paciente com microscopia negativa. A área de trabalho tem que estar livre de ADN amplificado. É crucial aquecer as amostras a 95°C por, pelo menos, 20 minutos de forma a inactivar as bactérias vegetativas. Poderá ser usado qualquer procedimento de extracção de ADN desde que produza ADN amplificável de bactérias. O seguinte protocolo rápido produz também, normalmente, ADN adequado para amplificação:

- 1a. Ao usar bactérias cultivadas em meio sólido, colher as bactérias com uma ansa de inoculação e suspender em aproximadamente 300 µl de água ("molecular biology grade").
- 1b. Ao usar bactérias cultivadas em meio líquido, aplicar directamente 1 ml, ao usar directamente material do paciente aplicar 500 µl da amostra descontaminada*. Precipitar as bactérias centrifugando, a aproximadamente 10000 x g durante 15 min, numa centrífuga de bancada normal com um rotor estanque a aerossóis, numa câmara de segurança de classe II. Descartar o sobrenadante e ressuspender as bactérias em 100-300 µl de água (para amostras de culturas) ou 100µl de água (para material directo do paciente) fazendo vortex.
2. Incubar as bactérias dos passos 1a ou 1b durante 20 min a 95°C num banho de água.
3. Incubar durante 15 min num banho ultrasónico.
4. Centrifugar durante 5 min à velocidade máxima e usar 5 µl do sobrenadante para a PCR. No caso de a solução de ADN ser para armazenar durante um período longo, transferir o sobrenadante para um novo tubo.

* As amostras devem ser processadas usando o método NALC/NaOH de acordo com a publicação CDC "Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory".

Os protocolos detalhados podem ser obtidos a partir do distribuidor local ou a partir de: www.hain-lifescience.de/pdf/dnaisol_myco.pdf

O teste também foi validado com o kit **GenoLyse®** (ver capítulo Informações Para Encomenda), que pode ser alternativamente usado para isolamento de ADN de material directo. Para instruções de utilização recorra, por favor, ao manual do kit **GenoLyse®**.

Amplificação

Preparar a mistura de amplificação (45 µl) numa sala livre de ADN. A amostra de ADN deve ser adicionada numa área separada.

Mistura por tubo:

- 35 µl de PNM
- 5 µl de tampão de PCR 10x – não fornecido
- x µl de solução de $MgCl_2$ ¹⁾ – não fornecida
- 1-2 unidades de ADN polimerase termoestável (consultar o manual) – não fornecida
- y µl de água (“molecular biology grade”) para obter um volume de 45 µl (não considerando o volume de enzima) – não fornecida
- Adicione 5 µl de solução de ADN (20-100 ng de ADN), levando a um volume final de 50 µl (não considerando o volume da enzima).

¹⁾ Dependendo do sistema enzima/tampão usado, a concentração óptima de $MgCl_2$ pode variar entre 1,5 e 2,5 mM. Note, por favor, que alguns tampões de incubação já possuem $MgCl_2$.

Determine o número de amostras a ser amplificadas (número de amostras a ser analisadas mais as amostras controlo). Uma amostra de controlo negativo, por exemplo, contém 5 µl de água em vez da solução de ADN. Prepare uma “master mix” contendo todos os reagentes excepto a solução de ADN e misture bem (não use o vortex). Faça alíquotas de 45 µl para tubos de PCR.

Programa de amplificação:

	amostras de culturas	directamente do material do paciente
5 min ²⁾ 95°C	1 ciclo	1 ciclo
30 sec 95°C 2 min 58°C	} 10 ciclos	10 ciclos
25 sec 95°C 40 sec 53°C 40 sec 70°C	} 20 ciclos	30 ciclos
8 min 70°C	1 ciclo	1 ciclo

²⁾ Com algumas ADN polimerases do tipo “hot start”, este passo tem que ser alongado (consultar, por favor, o manual da enzima).

Os produtos de amplificação poderão ser armazenados de +4 a -20°C.

Para verificar a reacção de amplificação, 5 µl de cada amostra poderão ser directamente aplicados num gel de agarose 2% sem adição de “loading buffer”. Os amplicons produzidos têm um tamanho de aproximadamente 63 pb (Controlo de Amplificação), 115 bp (Complexo *M. tuberculosis*), 166 pb (*rpoB*), 120 pb (*katG*) e 110 pb (*inhA*), respectivamente.

Hibridização

Preparação

Pré-aqueça o banho de água com agitação/**TwinCubator®** a **45°C**; o desvio máximo tolerado em relação à temperatura alvo é de $\pm 1^{\circ}\text{C}$. Pré-aqueça as soluções HYB e STR a 37-45°C antes de as usar. Os reagentes têm que estar livres de precipitados (note, no entanto, que a solução CON-D é opaca). Misture se necessário. Aqueça os restantes reagentes, com excepção do CON-C e do SUB-C, à temperatura ambiente. Usando um tubo adequado, dilua 1:100 o Conjugado Concentrado (CON-C, laranja) e o Substrato Concentrado (SUB-C, amarelo) com as quantidades necessárias dos respectivos tampões (**CON-C com CON-D, SUB-C com SUB-D**). Agite bem e deixe estabilizar à temperatura ambiente. Para cada tira, adicione 10 µl de concentrado a 1ml do tampão respectivo. Dilua o CON-C antes de cada utilização. O SUB-C diluído é estável durante 4 semanas se armazenado à temperatura ambiente e protegido da luz.

1. **Dispense 20 µl da Solução de Desnaturação (DEN, azul) num canto de cada um dos poços usados.**
2. **Adicione à solução 20 µl da amostra amplificada, com a pipeta aspire e dispense para misturar bem e incube à temperatura ambiente durante 5 minutos.**
Entretanto, retire as tiras do tubo, usando uma pinça, e marque-as com um lápis abaixo do marcador colorido. Use sempre luvas quando está a manusear as tiras.
3. **Cuidadosamente, adicione a cada poço 1 ml de Tampão de Hibridização (HYB, verde) pré aquecido. Agite suavemente a tina até que a solução adquira uma cor homogénea.**
Tenha cuidado para não salpicar solução para os poços vizinhos.
4. **Coloque uma tira em cada poço.**
As tiras têm que ficar completamente imersas na solução e com o lado revestido pelas sondas (identificável pela marcador colorido perto da extremidade inferior) virado para cima. Usando pinças, volte as tiras que poderão ter ficado com a face referida voltada para baixo aquando da imersão na solução. Limpe cuidadosamente as pinças depois de cada utilização para evitar contaminação. O mesmo se aplica aos passos seguintes.
5. **Coloque a tina num banho de água com agitação/TwinCubator® e incube durante 30 minutos a 45°C.**

Ajuste a frequência da agitação de maneira a obter uma mistura constante e completa da solução. Para permitir uma transferência de calor adequada, a tina tem que ser imersa na água até, pelo menos, 1/3 da sua altura.

6. Aspire completamente o Tampão de Hibridização.

Use, por exemplo, uma pipeta Pasteur ligada a uma bomba de vácuo.

7. Adicione 1 ml de Solução de Lavagem Adstringente (STR, vermelho) a cada tira e incube durante 15 minutos a 45°C num banho de água com agitação/TwinCubator®.

8. A partir deste passo, trabalhe à temperatura ambiente.

Remova completamente a Solução de Lavagem Adstringente.

Rejeite a Solução de Lavagem para um contentor e remova todos os fluidos remanescentes, voltando ao contrário a tina e colocando-a sobre papel absorvente. Este procedimento também se aplica a todos os outros passos de lavagem.

9. Lave cada tira uma vez com 1 ml de Solução Rinse (RIN) durante 1 minuto numa plataforma de agitação/TwinCubator® (rejeite o RIN depois da incubação).

10. Adicione 1 ml do conjugado diluído (ver acima) a cada tira e incube durante 30 minutos numa plataforma de agitação/TwinCubator® (rejeite o RIN depois da incubação).

11. Remova a solução e lave cada tira duas vezes, durante 1 minuto, com 1 ml de Solução Rinse (RIN) e uma vez, durante 1 minuto, com aproximadamente 1 ml de água destilada (ex., use uma garrafa de lavagem) numa plataforma de agitação/TwinCubator® (rejeite a solução em cada lavagem).

Assegure-se que remove quaisquer vestígios de água depois da última lavagem.

12. Adicione 1 ml de substrato diluído (ver acima) a cada tira e incube no escuro sem agitação.

Dependendo das condições do teste (por ex., temperatura ambiente), o tempo de incubação do substrato pode variar entre 3 e 20 minutos. Um alongamento dos tempos de incubação do substrato pode levar a um aumento do ruído da coloração de fundo, o que pode impossibilitar a interpretação dos resultados.

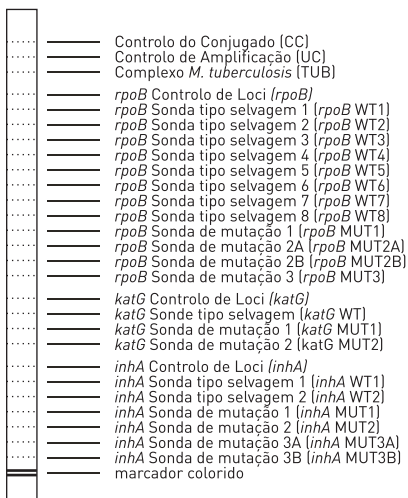
13. Pare a reacção enxaguando brevemente por duas vezes com água destilada.

14. Usando pinças, remova as tiras da tina e seque-as entre duas camadas de papel absorvente.

Avaliação e Interpretação dos Resultados

Cole as tiras a armazene-as protegidas da luz. Uma ficha de avaliação é fornecida com o kit, podendo também ser obtida por download em:

www.hain-lifescience.de/pdf/mtbdrplus_evaluation.pdf Ao usar esta ficha de avaliação, cole as tiras desenvolvidas nos campos designados alinhando as bandas CC e AC com as linhas respectivas na ficha. Determinar o status de resistência e anotar na respectiva coluna; no capítulo subsequente são dados exemplos de avaliação que podem servir como ajuda à interpretação. O molde fornecido serve, também, como ajuda para a avaliação e deve ser alinhado com as bandas AC e CC da tira. Cada tira possui um total de 27 zonas de reacção (ver a figura).



Nota: A tira não é exibida no tamanho original e não deve ser usada para interpretação.

As bandas de uma tira não têm que mostrar todas a mesma intensidade de sinal.

Controlo do Conjugado (CC)

Tem que haver desenvolvimento de uma linha nesta zona, documentando a eficiência da ligação do conjugado e da reacção do substrato.

Controlo de Amplificação (AC)

Quando o teste é realizado correctamente o amplicon de controlo vai-se ligar à zona de controlo de amplificação. O aparecimento desta banda exclui erros durante a extracção, amplificação e transporte de inibidores de amplificação. No caso de um resultado positivo, o sinal da zona de controlo de amplificação pode ser fraco ou mesmo desaparecer. Isto pode-se dever a reacções de competição durante a amplificação. No entanto, neste caso a reacção de amplificação foi realizada correctamente e o teste não precisa de ser repetido.

Uma banda ausente, no caso, de um resultado de teste negativo indica erros durante a preparação da amplificação ou transporte de inibidores de amplificação.

Neste caso, o teste não é válido e a amostra respectiva tem que ser repetida.

Complexo *M. tuberculosis* (TUB)

Esta zona hibridiza, tal como são conhecidas, com amplicons gerados a partir de todos os membros conhecidos do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Se a zona TUB é negativa, a bactéria testada não pertence ao complexo *M. tuberculosis* e não pode ser avaliada por este sistema de teste.

Controlo de Loci (*rpoB*, *katG* e *inhA*).

A zona de controlo de Loci detecta a região do gene específica para o respectivo Loci e deve apresentar sempre um sinal positivo.

Sondas Tipo Selvagem

As sondas Tipo Selvagem incluem as áreas de resistência mais importantes dos genes respectivos (ver figura 1, tabela 1, 2 e 3). Quando todas as sondas Tipo Selvagem de um gene apresentam um sinal positivo, não existe mutação detectável dentro das regiões examinadas. A estirpe testada é sensível ao antibiótico respectivo.

No caso de uma mutação, o respectivo amplicon não se pode ligar à sonda tipo Selvagem correspondente. A ausência de sinal para, pelo menos, uma das sondas Tipo Selvagem indica resistência da estirpe testada ao antibiótico.

Somente as bandas com uma intensidade igual ou superior à intensidade da zona de controlo de amplificação devem ser consideradas.

Cada padrão que se desvie do padrão tipo Selvagem indica resistência da estirpe testada. O padrão de bandas obtido com as sondas *rpoB* permite tirar conclusões acerca da resistência à rifampicina da estirpe testada, o padrão de bandas obtido com as sondas *katG* permite tirar conclusões acerca do nível elevado de resistência à isoniazida, o padrão de bandas obtido com as sondas *inhA* permite tirar conclusões do nível baixo de resistência à isoniazida da estirpe testada, respectivamente.

Sondas de mutação

As sondas de mutação detectam algumas das mutações mais comuns que medeiam a resistência (ver tabela1, 2 e 3). Comparada com as outras sondas, os sinais positivos da sonda de mutação *rpoB* MUT2A e MUT2B podem apresentar um sinal mais fraco. Somente as bandas com uma intensidade igual ou superior à intensidade da zona de controlo de amplificação devem ser consideradas.

Cada padrão que se desvie do padrão tipo Selvagem indica resistência da estirpe testada. O padrão de bandas obtido com as sondas *rpoB* permite tirar conclusões acerca da resistência à rifampicina da estirpe testada, o padrão de bandas *katG* acerca do nível elevado de resistência à isoniazida e o padrão de bandas *inhA* do nível baixo de resistência à isoniazida, respectivamente.

Notar os seguintes casos especiais:

1. Existe a possibilidade dos espécimes testados conterem uma estirpe heterogénea. Se, durante a investigação esta estirpe desenvolveu apenas uma resistência parcial, uma das sondas de mutação assim como a sonda tipo selvagem correspondente pode aparecer.
2. Existe a possibilidade dos espécimes testados conterem mais do que uma estirpe *M. tuberculosis* (devido à mistura de culturas ou contaminação). Se, pelo menos, uma destas estirpes possuir uma mutação, uma das sondas de mutação assim como a sonda tipo selvagem correspondente pode aparecer.

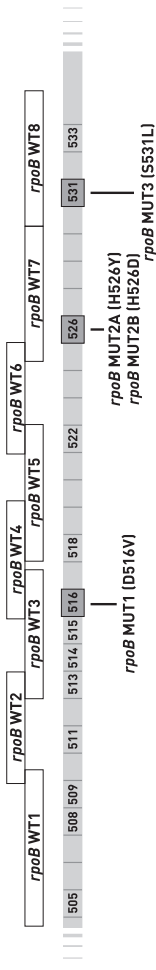


Figura 1: Região de resistência à rifampicina do gene *rpoB*.

rpoB WT1-8: sondas *rpoB* tipo selvagem; *rpoB* MUT1-3: sondas de mutação *rpoB*. Os números especificam as posições dos aminoácidos (códon) para todas as mutações listadas na tabela. Os códon para os quais as sondas foram desenhadas estão sublinhados.

Tabela 1: Mutações no gene *rpoB* e as sondas correspondentes tipo selvagem e de mutação (modificado de acordo com Telenti et al. 1993, Lancet, 341: 647-650)

Ausência da sonda(s) tipo selvagem	codão analisado	sonda de mutação	mutação
<i>rpoB</i> WT1	505-509		F505L T508A S509T
<i>rpoB</i> WT2	510-513		L511P*
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517		Q513L* Q513P del514-516
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<i>rpoB</i> MUT1	D516V D516Y del515
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522		del518* N518I
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>rpoB</i> WT7	526-529	<i>rpoB</i> MUT2A <i>rpoB</i> MUT2B	H526Y H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<i>rpoB</i> MUT3	S531L S531P S531Q* S531W L533P

* Esta mutação rara foi apenas teoricamente (*in silico*) detectada. É assim possível que a mutação não possa ser detectada *in vitro*.

Tabela 2: Mutações no gene *katG* e as sondas correspondentes tipo selvagem e de mutação

Ausência da sonda(s) tipo selvagem	codão analisado	sonda de mutação	mutação
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1	S315T1
		<i>katG</i> MUT2	S315T2

Tabela 3: Mutações na região promotora *inhA* e as sondas correspondentes tipo selvagem e de mutação

Ausência da sonda(s) tipo selvagem	Posição do ácido nucleico analisado	sonda de mutação	mutação
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T8A

Exemplos de Avaliação

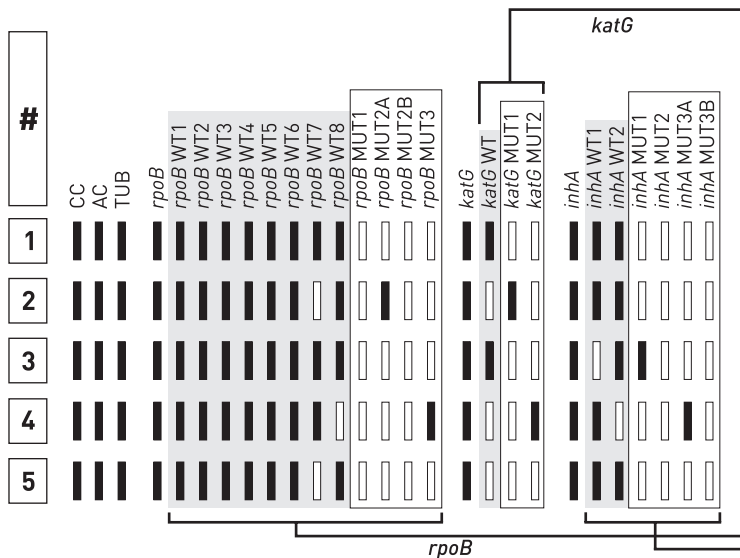


Figura 2: Exemplos de padrões de bandas e da sua avaliação relativamente à resistência à rifampicina e/ou isoniazida.

Se todas as sondas tipo selvagem apresentarem um sinal, classificar como positivo e marcar “+” na coluna WT do gene respectivo. Se, pelo menos uma das bandas tipo selvagem estiver ausente, classificar como negativo e marcar “-” na coluna WT do gene respectivo.

Uma entrada negativa na coluna das mutações apenas se faz quando nenhuma das bandas de mutação apresenta coloração. Se, pelo menos uma das bandas de mutação apresentar coloração classificar como mutação positiva.

TUB	<i>rpoB</i> WT	<i>rpoB</i> MUT	<i>katG</i> WT	<i>katG</i> MUT	<i>inhA</i> WT	<i>inhA</i> MUT	RMP		INH	
							sensitive	resistant	sensitive	resistant
+	+	-	+	-	+	-	+		+	
+	-	+	-	+	+	-		+		+
+	+	-	+	-	-	+	+			+
+	-	+	-	+	-	+		+		+
+	-	-	-	-	+	-		+		+

inhA

O exemplo 1 mostra o padrão de bandas tipo selvagem. Todas as sondas tipo selvagens apresentam sinal, mas nenhuma das sondas de mutação; por isso o gráfico de avaliação tem um "+" nas três colunas tipo selvagem e um "-" nas três colunas de mutação. Sendo assim, as caixas para a rifampicina (RMP) e Isoniazida (INH) são marcadas como sensíveis.

Uma das sondas tipo selvagem do *rpoB* e do *katG* está ausente no exemplo 5; por isso a caixa para o *rpoB* WT e *katG* WT são marcadas com um "-". Como nenhuma das sondas de mutação se desenvolveu, esta caixa também é marcada com um "-". A região promotora do *inhA* não se desvia do padrão tipo selvagem. A estirpe é avaliada como resistente ao RMP e INH. A resistência ao INH é causada pela mutação no gene *katG* e, é deste modo uma resistência de nível elevado à isoniazida.

Limitações

As declarações dadas neste manual relativas às capacidades do método referem-se a amostras cultivadas e material pulmonar directo com microscopia positiva. Os dados sobre qualquer material directo extrapulmonar com microscopia positiva não são suficientes para tirar conclusões sobre a aplicabilidade do método.

Tal como qualquer teste baseado em ADN, este teste apenas pesquisa a sequência de ácidos nucleicos e não a sequência de aminoácidos. Assim, é possível que mutações que não provocam uma troca de aminoácidos (mutações silenciosas) possam produzir a ausência de uma ou mais sondas de tipo selvagem.

Dados mais recentes indicam que apesar da mutação da L533P a respectiva estirpe *M. tuberculosis* pode ainda ser RMP sensível. Deste modo, se a banda WT8 está ausente e a sonda *rpoB* MUT3 não se desenvolve, deveria ser considerado os resultados fenotípicos da determinação da resistência.

Em anos recentes têm sido publicadas mutações adicionais que provocam a resistência à rifampicina dentro da região testada do gene *rpoB*. Como se tratam de mutações muito raras, não estão acessíveis para processos de validação deste sistema de teste, elas foram apenas detectadas *in silico*. Uma detecção *in silico*, no entanto, não exclui a possibilidade de que algumas destas mutações não possam ser detectadas *in vitro*.

O teste **GenoType® MTBDRplus** apenas detecta as resistências do complexo *M. tuberculosis* que têm as suas origens nas regiões examinadas dos genes *rpoB*, *katG* e *inhA*. Resistências com origem em mutações em outros genes ou regiões genómicas, assim como, outros mecanismos de resistência à rifampicina e isoniazida não serão detectados por este teste.

O utilizador deve ter ou deve adquirir informação sobre o padrão de distribuição das mutações locais dos genes analisados com este teste.

A presença de múltiplas espécies bacterianas na amostra a ser analisada pode impedir a interpretação do teste.

Teoricamente, uma resistência pode existir apesar de se obter um padrão de tipo selvagem. Se, durante o estudo, a amostra tiver uma estirpe que desenvolveu unicamente uma resistência parcial que não está coberta pelas sondas de mutação, o padrão tipo selvagem vai aparecer. Se a amostra tiver mais do que uma estirpe de *M. tuberculosis* (devido à mistura de culturas ou contaminação) e uma possuir uma mutação, que não está coberta pelas sondas de mutação, o padrão tipo selvagem vai aparecer. Tal como com outros testes de diagnóstico, os resultados deste teste

podem ser apenas interpretados em combinação com dados laboratoriais e clínicos adicionais disponibilizados ao médico responsável.

Antes da amplificação, o ADN tem que ser isolado a partir de bactérias cultivadas ou directamente de material pulmonar do paciente com microscopia positiva, por um método adequado. Deve-se assegurar que o ADN modelo é eficientemente amplificado durante a reacção de amplificação.

O teste funciona apenas dentro dos limites das regiões genómicas para que foram escolhidas as sondas. Uma potencial análise de sequência permanece reservada para o prosseguimento das investigações.

Tal como qualquer sistema de detecção baseado na hibridização este sistema comporta a possibilidade de que variações de sequência das regiões genómicas para que os primers e sondas foram escolhidas, para as quais a detecção do teste não foi desenhada, possam levar a resultados falsos. Devido à alta variabilidade dos genomas bacterianos é possível que alguns sub-tipos não sejam detectados. O teste reflecte o estado de conhecimento da Hain Lifescience.

Este teste deve ser executado por pessoal bem treinado no procedimento de teste e familiarizado com métodos de biologia molecular.

O desempenho da avaliação deste sistema de teste foi realizado utilizando a Hot-StarTaq polymerase da Qiagen (Hilden, Germany).

Resolução de Problemas

Sinais globalmente fracos ou inexistência de sinais (incluindo a zona do Controlo do Conjugado)

- Temperatura ambiente demasiado baixa ou reagentes não equilibrados com a temperatura ambiente.
- Ausência de, ou utilização de quantidade demasiado pequena de CON-C e/ou SUB-C.

Sinais fracos ou inexistência de sinais excepto na zona do Controlo do Conjugado

- A qualidade e/ou quantidade do ADN isolado não permite uma amplificação eficiente. Verificar o amplicon num gel de agarose 2%. No caso do amplicon não ser visível, repetir a extracção e a amplificação do ADN. Se necessário, experimentar um método diferente para a extracção (ver capítulo Extracção de ADN).
- Temperatura de incubação demasiado alta.

Coloração não homogénea

- As tiras não foram completamente imersas durante os passos de incubação.
- A tina não foi agitada de forma apropriada.

Alto ruído de fundo na coloração

- CON-C e/ou SUB-C usados demasiado concentrados.
- Os passos de lavagem não foram executados com o cuidado necessário.
- Soluções de lavagem demasiado frias.

Resultados inesperados

- Temperatura de incubação errada.
- Tampão de Hibridização e/ou Solução de Lavagem Adstringente não pré aquecidas ou misturadas de forma apropriada.
- Contaminação do ADN isolado e/ou dos agentes de amplificação com ADN isolado e/ou amplificado. Quando os reagentes de amplificação estão contaminados, uma amostra de controlo negativa vai mostrar também o respectivo padrão de bandas.
- Contaminação de poços vizinhos por salpicos durante a adição de Tampão de Hibridização.

- Dependendo da quantidade usada de ADN amplificado e das condições específicas de reacção, pode ocorrer um desenvolvimento de cor forte e rápido. Em tais casos, pare a incubação do substrato logo que os sinais sejam claramente visíveis, de maneira a prevenir o desenvolvimento de bandas de hibridização cruzada.
- Cultura impura como material inicial ou mais de que uma mutação na estirpe testada.
- Mutação silenciosa na região da sonda (ver capítulo Limitações).

Materiais Necessários mas não Fornecidos

- ADN polimerase termoestável com tampão (recomendação: enzima "hot start", taxa de extensão: 2-4 kb/min a 72°C, meia-vida: 10 min a 97°C, 60 min a 94°C, eficiência de amplificação: $>10^5$ vezes)
- Água ("molecular biology grade")
- Banho de água com agitação/**TwinCubator**[®]
- Cilindro graduado
- Cronómetro
- Luvas descartáveis
- Papel absorvente
- Pinças
- Pipetas ajustáveis para 10, 20, 200, e 1000 µl
- Plataforma de agitação/**TwinCubator**[®]
- Pontas de pipeta descartáveis, estéreis e com filtro
- Reagentes de extracção de ADN para amplificação, bem como o equipamento necessário
- Termociclador (taxa de aquecimento 3°C/sec, taxa de arrefecimento 2°C/sec, precisão +/- 0,2°C)
- Termómetro calibrado
- Tubos para termociclador; livres de DNases e RNases

Conteúdo do Kit

	Fornecido	
Tiras de membrana cobertas com sondas específicas (STRIPS)	12	96
Mistura Primer/Nucleótido (PNM) Contém primers específicos, nucleótidos, <1% Dimetil Sulfoxido, corante	0,5 ml	4 ml
Solução de Desnaturação (DEN) pronto a usar Contém <2% NaOH, corante	0,3 ml	2,4 ml
Tampão de Hibridização (HYB) pronto a usar Contém 8-10% de tensoactivos aniónicos, corante	20 ml	120 ml
Solução de Lavagem Adstringente (STR) pronto a usar Contém >25% de um composto de amónio quaternário, <1% de tensoactivos aniónicos, corante	20 ml	120 ml
Solução Rinse (RIN) pronto a usar Contém tampão, <1% NaCl, <1% tensoactivos aniónicos	50 ml	360 ml
Conjugado Concentrado (CON-C) concentrado Contém o conjugado streptavidina – fosfatase alcalina, corante	0,2 ml	1,2 ml
Tampão do Conjugado (CON-D) Contém tampão, 1% de reagente bloqueador, <1% NaCl	20 ml	120 ml
Substrato Concentrado (SUB-C) concentrado Contém Dimetil Sulfoxido, solução do substrato	0,2 ml	1,2 ml
Tampão do Substrato (SUB-D) Contém tampão, <1% NaCl, <1% MgCl ₂	20 ml	120 ml
Tina, ficha de avaliação	1 de cada	4 de cada
Manual de instruções, modelo	1 de cada	1 de cada

Informações Para Encomenda

GenoLyse® para 96 amostras

Ref. nº 51610

GenoType® MTBDRplus **Molekulárně genetická analýza pro identifikaci rezistence k rifampicinu a/nebo isoniazidu pro komplex *Mycobacterium tuberculosis***

Metodika

Test **GenoType® MTBDRplus** je založen na technologii **DNA•STRIP®** a umožňuje molekulárně genetickou identifikaci komplexu *M. tuberculosis* a detekuje jeho rezistenci na rifampicin a/nebo isoniazid z kultivačních vzorků nebo plicního mikroskopicky pozitivního materiálu. Identifikace rezistence na rifampicin je založena na detekci nejvýznamnějších mutací genu *rpoB* (kóduje β -podjednotku RNA polymerázy). Identifikace rezistence na vysokou hladinu isoniazidu je založena na detekci sekven-ce genu *katG* (kóduje katalázu) a identifikace rezistence na nízkou hladinu isoniazidu je založena na detekci promotorové sekven-ce genu *inhA* (kóduje NADH enoyl ACP reduktázu).

Celý postup je rozdělen do tří kroků: Izolace DNA z kultivačního materiálu (kultivační misky/tekuté médium) nebo přímý materiál (plicní, mikroskopicky pozitivní, dekontaminovaný) – činidla potřebná pro izolaci nejsou součástí kitu), multiplex PCR s biotinylovanými primery (nezbytná termostabilní DNA polymeráza není součástí poskytované sady) a reverzní hybridizace.

Hybridizace zahrnuje následující kroky: chemická denaturace amplifikovaných produktů, hybridizace jednořetězcových, biotinem značených, amplikonů se sondami fixovanými na proužku nitrocelulózové membrány, promytí, přidání konjugátu streptavidin/alkalická fosfatáza (AP), která vede k vizualizaci barevných proužků na strip-ech nitrocelulózové membrány. Snadné a rychlé vyhodnocení výsledků podle přiložené šablony a formuláře pro vyhodnocení (Tabulky).

Uskladnění a bezpečnostní opatření

Ihned po dodání uskladněte Primer/Nukleotidovou směs (PNM) při teplotě 2-8°C odděleně od jakýchkoli potencionálních zdrojů kontaminace DNA. Pokud je nutná delší doba uskladnění (více než 4 týdny), doporučuje se skladovat při teplotě -20°C. Abyste se vyhnuli opakovanému zmrazování a rozmrazování, rozdělte PNM na menší díly. Všechny ostatní komponenty kitu skladujte při teplotě 2-8°C. Nepoužívejte reagenty po uplynutí expirační doby.

Vzorky pacientů a kultury narostlé z těchto vzorků je třeba vždy považovat za potenciálně infekční. Vzorky od rizikových pacientů a kultury narostlé z těchto vzorků je vždy třeba označit a manipulovat s nimi za náležitých bezpečnostních podmínek. Dodržujte veškeré federální, státní, místní a ekologické předpisy. Vždy pracujte v ochranném oblečení a v rukavicích.

Manipulace se vzorkem a jeho příprava až po tepelnou inaktivaci musí být prováděna v bezpečnostním boxu třídy II. Před tepelnou inaktivací musí být vzorky centrifugovány v rotoru s protiaerosolovou úpravou. Rotor s protiaerosolovou úpravou otevíráte pouze v bezpečnostním boxu. Po tepelné inaktivaci už může být používán standardní rotor a centrifugace může probíhat vně bezpečnostního boxu.

Dodržujte běžná bezpečnostní opatření pro provozy a zařízení, kde se provádí amplifikace. Je nezbytné, aby činidla a materiály používané pro izolaci DNA a amplifikaci neobsahovaly DNázy.

Při zacházení s činidly, která jsou součástí dodávané soupravy, je třeba dodržovat následující bezpečnostní opatření:

Denaturační roztok (DEN) obsahuje <2% NaOH a dráždí oči a pokožku (R 36/38 a S 26-37/39-45).

Substrátový koncentrát (SUB-C) obsahuje dráždivý dimethylsulfoxid (R 36/37/38, S 23-26-36).

Další informace lze stáhnout z adresy:

www.hain-lifescience.com/products/msds.html

Kontrola kvality

Z důvodů ověření správnosti provedeného testu a správné funkce reagensů obsahuje každý proužek 5 kontrolních zón:

- zónu kontroly konjugátu ověřující vazbu konjugátu ke stripu a náležitou chromogenní reakci
- zónu kontroly amplifikace pro kontrolu úspěšné amplifikační reakce
- tři lokusové kontrolní zóny (*ropB*, *katG* a *inhA*) ověřující optimální senzitivitu reakce pro každý z testovaných genových lokusů

Izolace DNA

Je možné použít bakterie narostlé na pevných kultivačních půdách (např. Löwenstein-Jensen, Middlebrook) nebo v tekutém médiu (např. BACTEC, MB-Check), ale také mikroskopicky pozitivní přímý materiál (plicní vzorky). Test nesmí být používán na detekci mykobakterií přímo z mikroskopicky negativního materiálu získaného od pacienta. Pracovní prostředí nesmí obsahovat amplifikovanou DNA. Klíčové je zahřátí vzorků na teplotu 95°C, která musí působit minimálně 20 minut, aby došlo k inaktivaci vegetativních bakterií. Lze využít jakýkoli postup pro izolaci amplifikovatelné DNA z bakterií. Následujícím rychlým postupem lze obvykle získat DNA vhodnou pro amplifikaci:

- 1a. Použijete-li bakterie kultivované na pevném médiu, odeberte inokulační kličkou bakteriální kulturu a vytvořte suspenzi v přibližně 300 µl vody (normované pro molekulárně biologické metody).
- 1b. Použijete-li bakterie kultivované v tekutém médiu, vezměte přímo 1 ml tohoto média, pokud použijete přímý materiál, vezměte 500 µl dekontaminovaného* vzorku. Stočením vzorku po dobu 15 min ve standardní stolní centrifuze s rotorem odolným proti aerosolu v biohazardním boxu třídy II při cca 10000 x g sedimentujte bakterie. Supernatant slijte a vortexováním resuspendujte bakterie ve 100-300 µl vody (pro vzorky z kultury) nebo ve 100 µl vody (pro přímý materiál).
2. Inkubujte bakteriální suspenzi získanou podle kroku 1a nebo 1b při teplotě 95°C po dobu 20 minut (vodní lázeň).
3. Vložte na 15 minut do sonikační lázně.
4. Centrifugujte po dobu 5 minut při plné rychlosti a přímo použijte 5 µl supernatantu pro PCR. V případě, že se má roztok DNA uskladňovat po delší dobu, přeneste supernatant do čisté a označené zkuševky.

* Vzorky musí být dekontaminovány metodou NALC/NaOH podle CDC publikace „Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory“.

Podrobný popis lze získat od vašeho místního distributora nebo na adrese:
www.hain-lifescience.de/pdf/dnaisol_myc.pdf

Test byl také validován s kitem **GenoLyse®** (viz kapitola Objednávací informace), který může být alternativně využit pro izolaci DNA z přímého materiálu. Návod k použití naleznete v manuálu pro kit **GenoLyse®**.

Amplifikace

V místnosti bez přítomnosti DNA si připravte amplifikační směs (45 µl). Vzorek DNA by se měl přidávat v oddělené místnosti.

Na jeden vzorek smíchejte:

- 35 µl PNM
- 5 µl 10x polymerační inkubační pufr – nedodává se
- x µl MgCl_2 roztoku¹¹ – nedodává se
- 1-2 jednotka/ky termostabilní DNA polymerázy (odkaz na manuál) – nedodává se
- y µl vody k doplnění do celkového objemu 45 µl (nehledě na objem enzymu) – nedodává se
- Přidejte 5 µl roztoku DNA (20-100 ng DNA), čímž celkově dosáhnete objemu 50 µl (nehledě na objem enzymu).

¹¹ V závislosti na použitých enzymových/pufrovacích systémech se může optimální koncentrace MgCl_2 pohybovat od 1,5 do 2,5 mM. Povšimněte si, že některé inkubační pufrы již obsahují MgCl_2 .

Určete počet vzorků, které se mají amplifikovat (počet vzorků k analýze a vzorky kontrol). Negativní kontrolní vzorek např. obsahuje 5 µl vody namísto roztoku DNA. Připravte si „master mix“, který obsahuje všechna činidla s výjimkou roztoku DNA a dobře je promíchejte (nepoužívejte vortex). Alikvotujte mix v objemech 45 µl do připravených PCR zkumavek.

Amplifikační profil:

	kultivační vzorky	přímý materiál
5 min ²⁾ 95°C	1 cyklus	1 cyklus
30 s 95°C 2 min 58°C	10 cyklů	10 cyklů
25 s 95°C 40 s 53°C 40 s 70°C	20 cyklů	30 cyklů
8 min 70°C	1 cyklus	1 cyklus

²⁾ U některých z hot start DNA polymeráz je tento krok třeba rozšířit (prosíme postupujte podle manuálu pro daný enzym).

Vzorky amplifikované DNA lze uskladňovat při teplotě od +4 do –20°C.

Pro ověření amplifikační reakce použijte elektroforézu: naneste 5 µl každého vzorku přímo do 2% agarózového gelu, bez přidání nanášecího pufru. Amplikony mají délku přibližně 63 bp (Amplifikační kontrola), 115 bp (*M. tuberculosis* komplex), 166 bp (*lrpB*), 120 bp (*katG*) a 110 bp (*inhA*).

Hybridizace

Příprava

Předehejte třepací vodní lázeň/**TwinCubator®** na teplotu **45°C**; maximální tolerovaná odchylka od cílové teploty činí $\pm 1^\circ\text{C}$. Před použitím předehejte také roztoky HYB a STR na teplotu 37–45°C. Činidla musí být bez sraženin (povšimněte si, že roztok CON-D je neprůhledný). Podle potřeby protřepejte. Činidla s výjimkou CON-C a SUB-C nechte ohřát na laboratorní teplotu. Ve vhodné zkumavce zředte koncentrát konjugátu (CON-C, oranžový) a koncentrát substrátu (SUB-C, žlutý) v poměru 1:100 odpovídajícím pufrem (**CON-C s CON-D, SUB-C s SUB-D**) v potřebných množstvích. Dobře promíchejte a zahřejte na laboratorní teplotu. Na jeden strip si připravte 10 μl koncentráту, který se zředí 1 ml příslušného pufru. CON-C rozřeďte vždy před každým použitím. Naředěný SUB-C zůstane stabilní po 4 týdny, je-li uchováván za pokojové teploty a je-li chráněn před světlem.

1. **Do rohu každého zvoleného žlábků plastové destičky napipetujte 20 μl denaturačního roztoku (DEN, modrý).**
2. **Přidejte k roztoku 20 μl amplifikovaného vzorku, opakovaným stisknutím pipety nahoru a dolů dobře promíchejte a inkubujte při laboratorní teplotě po dobu 5 minut.**

Mezitím pomocí pinzety vyjměte ze zkumavky stripy a označte je tužkou pod barevný marker. Při manipulaci se stripy pracujte vždy v rukavicích.

3. **Do každého žlábků destičky opatrně přidejte 1 ml předem zahřátého hybridizačního pufru (HYB, zelený). Opatrně pohybujte plastovou destičkou tak dlouho, dokud roztok nemá homogenní zbarvení. Dávejte pozor, abyste roztok nepřelili do sousedních žlábků.**
4. **Do každého žlábků plastové destičky vložte strip.**
Stripy musí být v roztoku úplně ponořeny a část stripu (ta strana, na níž je barevný marker poblíž spodního okraje) musí být otočena vzhůru. Pomocí pinzety přetočte stripy, které se případně mohly obrátit během vkládání do roztoku. Abyste zabránili kontaminaci, po každém použití pinzetu pečlivě očistěte (nebo použijte jinou). Totéž platí i pro následující kroky.
5. **Umístěte plastovou destičku do třepací vodní lázně/**TwinCubator®** a inkubujte po dobu 30 minut při teplotě 45°C.**

Upravte frekvenci třepací vodní lázně tak, abyste dosáhli stabilního a důkladného promíchání roztoku. Kvůli adekvátnímu přenosu tepla musí být plastová destička ponořena do vody alespoň 1/3 své výšky.

6. **Úplně odsajte hybridizační pufr. (Například pomocí Pasteurovy pipety připojené k vývěvě.)**
7. **Na každý strip napipetujte 1 ml odmývacího roztoku (Stringent Wash Solution) (STR, červený) a inkubujte po dobu 15 minut při teplotě 45°C v třepací vodní lázniTwinCubator®.**
8. **Od tohoto kroku pracujte již při laboratorní teplotě. Úplně odstraňte odmývací roztok (Stringent Wash Solution).**

Vylijte promývací roztok (Wash Solution) do nádoby na odpad a odstraňte veškerou zbylou kapalinu tím, že přetočíte plastovou destičku i se stripy dnem vzhůru a jemně ji vyklepete na savý papír. Tento postup platí i pro všechny další kroky při oplachování.
9. **Omývejte 1x každý strip v 1 ml oplachovacího roztoku (Rinse solution) (RIN) po dobu 1 minuty na třepačce/TwinCubator® (po inkubaci RIN slijte).**
10. **Nalijte na každý strip 1 ml naředěného konjugátu (viz výše) a inkubujte 30 minut na třepačce/TwinCubator® (po době určené na reakci RIN opět slijte).**
11. **Vylijte roztok a oplachujte každý strip dvakrát po dobu jedné minuty v 1 ml oplachovacího roztoku (RIN) a jednou po dobu 1 minuty přibližně v 1 ml destilované vody (použijte například stříčku) za použití třepačky/TwinCubator® (pokaždé roztok vylijte).**

Ověřte si, že jste po posledním propláchnutí odstranili veškerou zbylou vodu ze žlábků plastové destičky.
12. **Přidejte 1 ml naředěného substrátu (viz výše) na každý strip a nechte reagovat bez přístupu světla a bez jakéhokoli protřepávání.**

V závislosti na podmínkách testování (např. na laboratorní teplotě) se může doba inkubace pohybovat v rozmezí 3 až 20 minut. Prodlužování času inkubace substrátu může vést k intenzivnějšímu zbarvení pozadí a může negativně ovlivnit interpretaci výsledků.
13. **Reakci ukončete krátkým dvojnásobným propláchnutím destilovanou vodou.**
14. **Pinzetou vyjměte stripy ze žlábků plastové destičky a usušte je mezi dvěma vrstvami savého papíru.**

Hodnocení a interpretace výsledků

Stripy nalepte a chráňte je před světlem. Formulář pro vyhodnocení (Tabulku), který tvoří součást kitu, lze stáhnout z adresy:

www.hain-lifescience.de/pdf/mtbdrplus_evaluation.pdf. Jestliže použijete přiložený formulář pro vyhodnocení (Tabulku), nalepte stripy do určených polí tak, že přiložíte zóny CC a AC k odpovídajícím barevným proužkům, které jsou vyznačeny na formuláři. Určete stav rezistence a ten zaznamenejte do příslušného sloupce; jako pomoc při interpretaci uvádíme v následující kapitole příklad vyhodnocení. Dodávaná šablona slouží jako pomůcka pro vyhodnocení výsledků a musí být přiložena tak, aby proužky AC a CC na stripu byly v úrovni s uvedenými proužky na šabloně. Každý strip má celkem 27 reakčních zón (proužků) (viz obrázek).

.....	————	Kontrola konjugátu (CC)
.....	————	Kontrola amplifikace (AC)
.....	————	<i>M. tuberculosis</i> complex (TUB)
.....	————	<i>rpoB</i> Kontrola lokuse (<i>rpoB</i>)
.....	————	<i>rpoB</i> Wild type sonda 1 (<i>rpoB</i> WT1)
.....	————	<i>rpoB</i> Wild type sonda 2 (<i>rpoB</i> WT2)
.....	————	<i>rpoB</i> Wild type sonda 3 (<i>rpoB</i> WT3)
.....	————	<i>rpoB</i> Wild type sonda 4 (<i>rpoB</i> WT4)
.....	————	<i>rpoB</i> Wild type sonda 5 (<i>rpoB</i> WT5)
.....	————	<i>rpoB</i> Wild type sonda 6 (<i>rpoB</i> WT6)
.....	————	<i>rpoB</i> Wild type sonda 7 (<i>rpoB</i> WT7)
.....	————	<i>rpoB</i> Wild type sonda 8 (<i>rpoB</i> WT8)
.....	————	<i>rpoB</i> Sonda s mutací 1 (<i>rpoB</i> MUT1)
.....	————	<i>rpoB</i> Sonda s mutací 2A (<i>rpoB</i> MUT2A)
.....	————	<i>rpoB</i> Sonda s mutací 2B (<i>rpoB</i> MUT2B)
.....	————	<i>rpoB</i> Sonda s mutací 3 (<i>rpoB</i> MUT3)
.....	————	<i>katG</i> Kontrola lokuse (<i>katG</i>)
.....	————	<i>katG</i> Wild type sonda (<i>katG</i> WT)
.....	————	<i>katG</i> Sonda s mutací 1 (<i>katG</i> MUT1)
.....	————	<i>katG</i> Sonda s mutací 2 (<i>katG</i> MUT2)
.....	————	<i>inhA</i> Kontrola lokuse (<i>inhA</i>)
.....	————	<i>inhA</i> Wild type sonda 1 (<i>inhA</i> WT1)
.....	————	<i>inhA</i> Wild type sonda 2 (<i>inhA</i> WT2)
.....	————	<i>inhA</i> Sonda s mutací 1 (<i>inhA</i> MUT1)
.....	————	<i>inhA</i> Sonda s mutací 2 (<i>inhA</i> MUT2)
.....	————	<i>inhA</i> Sonda s mutací 3A (<i>inhA</i> MUT3A)
.....	————	<i>inhA</i> Sonda s mutací 3B (<i>inhA</i> MUT3B)
.....	————	barevný marker

Pozn.: Membranový strip není zobrazen v originální velikosti a nesmí se používat pro interpretaci.

Všechny proužky na membráně nemusejí vykazovat stejnou intenzitu signálu.

Kontrola konjugátu (CC)

V této oblasti se musí objevit barevný proužek (zóna), který dokládá účinnost vazby konjugátu a reakci substrátu.

Kontrola amplifikace (AC)

Pokud je test proveden správně, kontrolní amplikon se váže k amplifikační kontrolní zóně na stripu. Pokud dojde k vývoji této zóny na stripu, chyby vzniklé během extrakce a amplifikace, včetně inhibitorů amplifikace, mohou být vyloučeny. V případě pozitivního výsledku testu může být signál amplifikační kontrolní zóny slabý nebo zmizet úplně. To může nastat v důsledku kompetice během amplifikace. V tomto případě je však amplifikační reakce provedena správně a test nemusí být opakován.

Chybějící AC proužek v případě negativního výsledku testu indikuje chyby vzniklé průběhu amplifikace nebo přítomnost inhibitorů amplifikace. V tomto případě je test neplatný a musí být pro daný vzorek opakován.

***M. tuberculosis* komplex (TUB)**

Tato zóna hybridizuje s amplikony, které jsou společné pro všechny druhy komplexu *Mycobacterium tuberculosis*. Pokud je TUB zóna negativní, testované mykobakterie nepatří do komplexu *M. tuberculosis* a nelze je hodnotit tímto testem.

Kontrola lokuse (*rpoB*, *katG* a *inhA*)

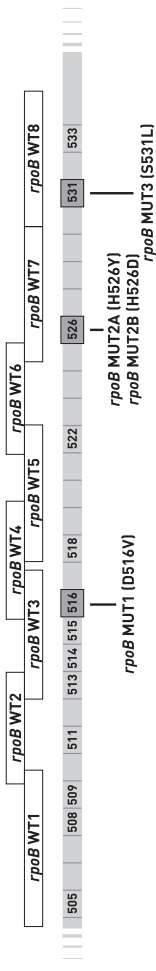
Lokusové kontrolní zóny detekují genovou oblast specifickou pro příslušný lokus a musí vždy vykazovat pozitivní signál.

Wild type sondy

Wild type sondy obsahují nejdůležitější oblasti rezistence příslušných genů (viz obrázek 1, tabulky 1, 2 a 3). Pokud jsou všechny wild type sondy daného genu pozitivní, není ve zkoumané oblasti žádná detekovatelná mutace. Testovaný kmen je senzitivní na příslušná antibiotika.

V případě mutace se příslušný amplikon nemůže navázat na odpovídající wild type sondu. Chybějící signál pro minimálně jednu z wild type sond proto indikuje rezistenci testovaného kmene na dané antibiotikum.

V úvahu jsou brány pouze ty proužky, jejichž intenzita je stejně silná nebo silnější než zóna kontroly amplifikace.



Obrázek 1: Oblast rezistence na rifamicin genu *rpoB*

rpoB WT1-8: *rpoB* wild type sondy; *rpoB* MUT1-3: *rpoB* mutované sondy. Číslice specifikují pozice aminokyselin (kodóny) všech mutací uvedených v tabulce. Zvýrazněny jsou kodóny, pro jejichž mutace byly navrženy sondy.

Každý profil, který se liší od wild type profilu, indikuje rezistenci testovaného kmene. Profil proužků získaný s *rpoB* sondami umožňuje vyvodit závěr o rezistenci na rifampicin, profil proužků získaný s *katG* sondami umožňuje vyvodit závěr o rezistenci na vysokou hladinu isoniazidu a profil proužků získaný s *inhA* sondami umožňuje vyvodit závěr o rezistenci na nízkou hladinu isoniazidu.

Sondy s mutací

Sondy s mutací detekují některé z nejběžnějších mutací zprostředovávající rezistenci (viz tabulky 1, 2 a 3). Ve srovnání s ostatními sondami může být intenzita pozitivního signálu u sond s mutací *rpoB* MUT2A a MUT2B slabší.

V úvahu jsou brány pouze ty proužky, jejichž intenzita je stejně silná nebo silnější než zóna kontroly amplifikace.

Každý profil, který se liší od wild type profilu, indikuje rezistenci testovaného kmene. Profil proužků získaný se *rpoB* sondami umožňuje vyvodit závěr o rezistenci na rifampicin, profil proužků získaný s *katG* sondami umožňuje vyvodit závěr o rezistenci na vysokou hladinu isoniazidu a profil proužků získaný s *inhA* sondami umožňuje vyvodit závěr o rezistenci na nízkou hladinu isoniazidu.

Povšimněte si následujících speciálních případů:

1. Existuje možnost, že testovaný vzorek obsahuje heterogenní kmen. Pokud se u vyšetřovaného vzorku vyvine částečná rezistence, může se na stripu objevit pozitivní signál jak u některé ze sond s mutací, tak i u wild type sond.
2. Existuje možnost, že testovaný vzorek obsahuje více než jeden kmen *M. tuberculosis* (směsná kultura nebo kontaminace). Pokud alespoň jeden z nich obsahuje mutaci, může se na stripu objevit pozitivní signál jak u některé ze sond s mutací, tak i u wild type sond.

Tabulka 1: Mutace v genu *rpoB* a odpovídající wild type sondy a sondy s mutací (modifikované dle Telenti et al. 1993, Lancet, 341: 647-650)

chybějící wild type sonda [-y]	analyzovaný kodón	sonda s mutací	mutace
<i>rpoB</i> WT1	505-509		F505L
			T508A S509T
<i>rpoB</i> WT2	510-513		L511P*
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517		Q513L* Q513P del514-516
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<i>rpoB</i> MUT1	D516V D516Y del515
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522		del518* N518I
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>rpoB</i> WT7	526-529	<i>rpoB</i> MUT2A	H526Y
		<i>rpoB</i> MUT2B	H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<i>rpoB</i> MUT3	S531L S531P S531Q* S531W L533P

* Tyto zřídka se vyskytující mutace byly zatím detekovány pouze teoreticky (*in silico*). Je proto možné, že tyto mutace nemohou být detekovány *in vitro*.

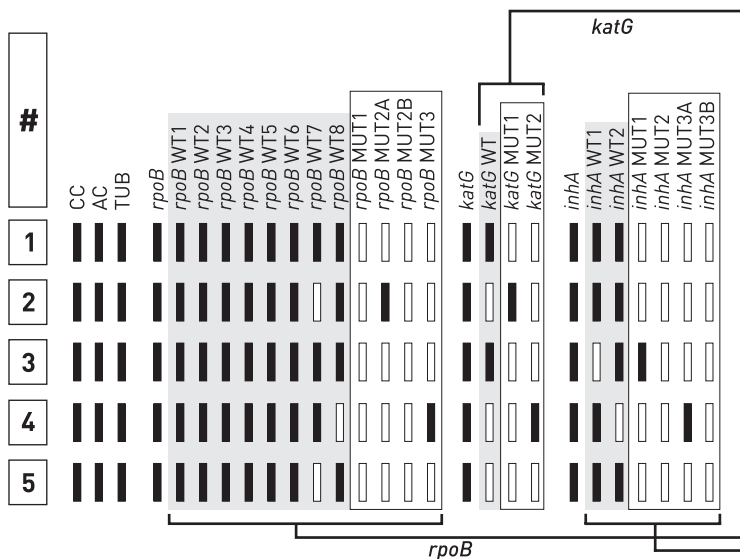
Tabulka 2: Mutace v genu *katG* a odpovídající wild type sondy a sondy s mutací

chybějící wild type sonda [-y]	analyzovaný kodón	sonda s mutací	mutace
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1	S315T1
		<i>katG</i> MUT2	S315T2

Tabulka 3: Mutace v promotorové oblasti genu *inhA* a odpovídající wild type sondy a sondy s mutací

chybějící wild type sonda [-y]	analyzovaná pozice nucleové kyseliny	sonda s mutací	mutace
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T8A

Příklady vyhodnocení



Obrázek 2: Příklady konfigurací proužků a jejich vyhodnocení vzhledem k určení rezistence na rifampicin a/nebo isoniazid

Pokud je detekován signál u všech wild type proužků, je to klasifikováno jako pozitivní reakce a označeno ve sloupci WT příslušného genu jako „+“. Pokud chybí alespoň jeden wild type proužek, je to klasifikováno jako negativní a označeno v tomtéž sloupci jako „-“. V případě, že se neobjeví signál u žádného z proužku se sondou s mutací, označí se ve sloupci mutací výsledek „-“. Pokud je alespoň jeden proužek se sondou s mutací pozitivní, je to klasifikováno jako mutace-pozitivní výsledek.

TUB	<i>rpoB</i> WT	<i>rpoB</i> MUT	<i>katG</i> WT	<i>katG</i> MUT	<i>inhA</i> WT	<i>inhA</i> MUT	RMP		INH	
	sensitive	resistant	sensitive	resistant	sensitive	resistant	sensitive	resistant	sensitive	resistant
+	+	-	+	-	+	-	+		+	
+	-	+	-	+	+	-		+		+
+	+	-	+	-	-	+	+			+
+	-	+	-	+	-	+		+		+
+	-	-	-	-	+	-		+		+

inhA

Příklad 1 ukazuje konfiguraci wild type proužků. Signál je detekován u všech wild type sond, ale není detekován u žádné ze sond z mutací, proto je ve vyhodnocovací tabulce „+“ ve všech třech WT sloupcích a „-“ ve všech třech sloupcích mutací. Podle toho jsou kolonky pro rifampicin (RMP) a isoniazid (INH) označeny jako senzitivní. U příkladu 5 chybí jedna z wild type sond pro *rpoB* a *katG*, proto jsou kolonky pro *rpoB* WT a *katG* WT označeny „-“. Protože nebyl detekován signál u žádné ze sond s mutací, jsou tyto kolonky označeny také „-“. Promotorová oblast genu *inhA* se neliší od wild type patternu. Kmen je hodnocen jako RMP a INH rezistentní. Rezistence k INH je dána mutací v genu *katG*, a kmen je proto rezistentní i na vyšší hladinu isoniazidu.

Omezení

Údaje poskytnuté v tomto manuálu se týkají kapacit metody vzhledem ke kultivačním vzorkům a plicním mikroskopicky pozitivním vzorkům z přímého materiálu. Není možno vyvodit závěr o možnosti použití extrapulmonárním mikroskopicky pozitivním přímém materiálu.

Jako každý test založený na detekci DNA je i tento test metodou zkoumající pouze sekvenci DNA a nikoliv sekvenci aminokyselin. Proto je možné, že mutace DNA, která nezpůsobí záměnu aminokyseliny (tichá mutace) a neovlivní tak vznik rezistence, znemožní vazbu amplikonu na příslušnou wild type sondu a kmen se bude jevit jako rezistentní, přestože je ve skutečnosti senzitivní.

Nejnovější data ukazují, že i přes výskyt L533P mutace může být daný kmen *M. tuberculosis* RMP senzitivní. Proto by měly být zváženy výsledky fenotypové rezistence i pokud chybí proužek WT8 a nebyl detekován pozitivní signál u *rpoB* MUT3 proužku.

V posledních letech byly publikovány další mutace vyskytující se v testované oblasti genu *rpoB* a způsobující vznik rezistence na rifampicin. Vzhledem k tomu, že se jedná o zřídka se vyskytující mutace, nebyly dostupné pro validační účely tohoto testu, ale byly detekovány pouze *in silico*. Detekce *in silico* však nevylučuje možnost, že některé z těchto mutací nemohou být detekovány *in vitro*.

Test **GenoType® MTBDRplus** detekuje pouze ty rezistence komplexu *M. tuberculosis*, které jsou způsobeny mutacemi genů *rpoB*, *katG* a *inhA*. Rezistence způsobené mutacemi v jiných genech/genových oblastech nebo jiné neznámé rifampicinové a isoniazidové rezistence nebo mechanismy nebudou tímto testem detekovány.

Uživatel musí mít nebo získat informaci o profilu mutací genů zkoumaných tímto testem.

Přítomnost různých bakteriálních druhů (smíšené bakteriální flóry) v analyzovaném vzorku by mohla komplikovat interpretaci tohoto testu.

Teoreticky může rezistence existovat i v případě wild type profilu. Pokud vyšetřovaný vzorek obsahuje kmen, u něhož se vyvinula částečná rezistence, která není detekována mutovanými sondami, objeví se/bude detekován wild type profil. V případě, že vzorek obsahuje více než jeden kmen *M. tuberculosis* (směsná kultura nebo kontaminace) a jeden z nich obsahuje mutaci, která není detekována sondami s mutací, bude detekován rovněž wild type profil. Stejně jako jiné diagnostické testy, výsledky tohoto testu lze interpretovat pouze v kombinaci s dalšími laboratorními a klinickými daty dostupnými pro odpovědného lékaře.

Před amplifikací je třeba vhodnou metodou izolovat DNA z vykultivovaných bakterií nebo plicního mikroskopicky pozitivního materiálu. Je třeba zajistit, aby templátová DNA byla během amplifikační reakce dostatečně namnožena.

Test pracuje pouze v těch oblastech genomu, z nichž byly vybrány sondy. Pro další vyšetření je možné použít sekvenaci.

Jako s každým detekčním systémem založeném na hybridizační bázi, lze tímto testovacím systémem detekovat velmi vzácné sekvenční variace v oblastech genomu, z nichž byly primery a sondy vybrány a detekce těchto oblastí, pro které nebyl test určen, může vést k chybným výsledkům. Vzhledem k vysoké variabilitě bakteriálních genomů je možné, že některé subtypy nebude možné tímto testem určit. Test odráží stav znalostí firmy Hain Lifescience.

Tento test by měl být prováděn pouze kvalifikovaným a vyškoleným personálem, který je též seznámen s molekulárně biologickými metodami.

K vyhodnocení tohoto testovacího systému byla použita HotStarTaq polymeráza od firmy Qiagen (Hilden, Germany).

Odstraňování závad

Celkově slabá nebo žádná výsledná reakce (včetně kontrolního proužku konjugátu)

- Příliš nízká laboratorní teplota resp. teplota činidel nebyla vyrovnána s laboratorní teplotou.
- Chybějící CON-C a/nebo SUB-C nebo i použití příliš malého množství těchto činidel.

Slabá nebo chybějící výsledná reakce kromě kontrolního proužku konjugátu

- Kvalita a/nebo kvantita izolované DNA neumožnila účinnou amplifikaci. Ověřte množství amplifikované DNA elektroforeticky na 2% agarózovém gelu. V případě, že není vidět žádný amplikon, opakujte izolaci i amplifikaci DNA. Lze vyzkoušet i jinou metodu izolace DNA (odkaz na „Izolace DNA“).
- Příliš vysoká inkubační teplota.

Nehomogenní barvení

- Během provádění testu nebyly stripy úplně ponořeny.
- Plastová destička nebyla řádně protřepána.

Výrazná barva pozadí

- Bylo použito příliš vysoké koncentrace CON-C a/nebo SUB-C.
- Nedostatečné promývání.
- Příliš chladný promývací roztok.

Neočekávaný výsledek

- Nesprávná inkubační teplota.
- Hybridizační pufr a/nebo odmyvací roztok (Stringent Wash Solution) nebyly dostatečně předeřhřáty nebo promíchány.
- Kontaminace izolované DNA a/nebo amplifikačních činidel izolovanou a/nebo amplifikovanou DNA. Jsou-li amplifikační činidla kontaminována, negativní kontrola (do které byla použita pouze voda) vykáže rovněž pozitivní proužek.
- Došlo ke kontaminaci sousedních žlábků přelitím při přidávání hybridizačního pufru.
- V závislosti na specifických reakčních podmínkách a na objemu použité amplifikované DNA může dojít k rychlému a barevně výraznému vývoji proužků. V těchto

- případech je nutné ihned přerušit inkubaci se substrátem, aby se předešlo cross-hybridizaci.
- Jako výchozí materiál nebyla použita čistá kultura nebo se v testovaném kmenu vyskytuje více než jedna mutace.
 - Tichá mutace v oblasti sondy (viz kapitola Omezení).

Nezbytný, avšak nedodávaný materiál

- činidla potřebná pro izolaci DNA za účelem její amplifikace a také nezbytná vybavení
- jednorázové rukavice
- jednorázové sterilní špičky s filtrem
- kalibrovaný teploměr
- odměrný válec
- PCR zkumavky, bez obsahu DNáz a RNáz
- pipety nastavitelné na objem 10, 20, 200 a 1000 μ l
- pinzety
- savý papír
- stopky
- termocyklér (rychlost ohřevu teploty: 3°C/s, rychlost ochlazování: 2°C/s, přesnost: $\pm 0,2^\circ\text{C}$)
- termostabilní polymeráza DNA s pufrém (doporučení: „hot start“ enzym, rychlost syntézy: 2-4 kb/min při teplotě 72°C, poločas: 10 minut při teplotě 97°C, 60 min při teplotě 94°C, amplifikační účinnost: $>10^5$ násobná)
- třepací vodní lázeň/**TwinCubator**®
- třepačka/**TwinCubator**®
- voda pro molekulární biologii

Obsah dodaného kitu

	setu	
Membránové stripy s fixovanými specifickými sondami (STRIPS)	12	96
Primery/Nukleotidová směs (PNM) obsahuje specifické primery, nukleotidy, <1% dimethylsulfoxid, barvivo	0,5 ml	4 ml
Denaturační roztok (DEN) přímo k použití obsahuje <2% NaOH, barvivo	0,3 ml	2,4 ml
Hybridizační pufr (HYB) přímo k použití obsahuje 8-10% aniontového tenzidu, barvivo	20 ml	120 ml
Odmývací roztok (STR) přímo k použití obsahuje >25% kvartérní amoniové sloučeniny, <1% aniontového tenzidu, barvivo	20 ml	120 ml
Oplachovací roztok (RIN) přímo k použití obsahuje blokovací činidlo, <1% NaCl, <1% aniontového tenzidu	50 ml	360 ml
Koncentrát konjugátu (CON-C) koncentrát Obsahuje konjugát alkalické fosfatázy se streptavidinem, barvivo	0,2 ml	1,2 ml
Konjugační pufr (CON-D) obsahuje pufr, 1% blokovacího činidla, <1% NaCl	20 ml	120 ml
Koncentrát substrátu (SUB-C) koncentrát obsahuje dimethylsulfoxid, roztok substrátu	0,2 ml	1,2 ml
Substrátový pufr (SUB-D) obsahuje pufr, <1% MgCl ₂ , <1% NaCl	20 ml	120 ml
Plastová destička, formulář pro vyhodnocení (Tabulka)	po 1 kusu	po 4 kusech
Příbalová informace, šablona pro vyhodnocení výsledků	po 1 kusu	po 1 kusu

Objednávací informace

GenoLyse® pro 96 vzorky

kat. číslo 51610



Hain Lifescience GmbH

Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany

www.hain-lifescience.de

REF

304

12

30496

96