

GenoLyse[®]

VER 1.0

Instructions for Use

IFU-51610-14

CE

IVD

for in vitro diagnostic use only

GenoLyse® Kit for Extraction of Bacterial DNA

Please read the instructions on hand completely and carefully before using the kit. Strictly adhere to the established procedure to obtain correct test results.

Intended Use

The **GenoLyse®** DNA extraction kit permits the fast and easy manual extraction of bacterial DNA for further use with the following diagnostic assays from Hain Lifescience: **GenoQuick® CT**, **GenoQuick® MTB**, **GenoType CMdirect**, **GenoType MTBC**, **GenoType MTBDRplus**, **GenoType MTBDRsl**, **GenoType Mycobacterium AS**, **GenoType Mycobacterium CM**, and **GenoType NTM-DR**. Depending on the subsequent test, patient specimens and/or cultured material can be used as starting material.

The kit is an in vitro diagnostic product for use in medical laboratories.

Principles of the Procedure

The whole procedure is divided into three steps: (i) pelleting of cells for removal of sample liquids, (ii) lysis under alkaline conditions at elevated temperature, and (iii) neutralization. The extracted DNA may directly be used for downstream applications or can be stored at -20°C.

Storage and disposal of kit constituents

Store all kit components at 2°C to 8°C. Do not use the reagents beyond their expiry date. Dispose of unused reagents and waste in accordance with federal, state, and local regulations.

Precautions for handling kit constituents

Observe all federal, state, and local safety and environmental regulations. Always wear suitable protective clothing and gloves.

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

Specimen Requirements

The applicable starting materials for the diagnostic test kit (**GenoQuick® CT**, **GenoQuick® MTB**, **GenoType CMdirect**, **GenoType MTBC**, **GenoType MTBDRplus**, **GenoType MTBDRsl**, **GenoType Mycobacterium AS**, **GenoType Mycobacterium CM**, or **GenoType NTM-DR**) are stated in the respective instructions for use. Observe the given instructions for storage, transport, and preparation of the specimens and, when indicated, special precautions for handling.

Precautions for handling specimens

Patient specimens and cultures made from patient specimens must always be considered as potentially infectious and must be handled accordingly (e.g. see [1] or [2]). Always wear suitable protective clothing and gloves. Samples from patients at risk (infected by pathogenic microorganisms including Hepatitis B and Human Immunodeficiency Virus (HIV)) and cultures made from those samples must always be labeled and handled under suitable safety conditions according to institutional guidelines.

Discard used pipette tips immediately after use in a container for biohazardous waste. After finishing the assay, discard all used disposables in a container for biohazardous waste.

Quality Control

Observe the usual precautions for nucleic acid extraction. It is essential that all materials (such as pipette tips) coming in contact with the reagents are free from DNases.

For detection of possible contamination events a negative control sample should be included in the sample set during DNA extraction. The preparation of negative controls is described in the chapter Procedure.

Procedure

A. For use with the GenoQuick® MTB, GenoType MTBC, GenoType MTBDRplus, GenoType MTBDRsl, GenoType Mycobacterium CM VER 1.0, or GenoType NTM-DR assay:

Handling of potentially infectious specimens must be carried out in a class II safety cabinet. Potentially infectious samples must be centrifuged in a class II safety cabinet or in an aerosol-tight rotor. Open aerosol-tight rotor in safety cabinet only. For inactivated samples, a standard rotor can be used for centrifugation outside the safety cabinet.

If a negative control sample for detection of possible contamination events shall be included in DNA extraction, pipette 100 µl Lysis Buffer (A-LYS) into a 1.5 ml screw cap tube. For further processing the negative control, proceed with step 4.

1. When using patient specimens (only **GenoQuick® MTB**, **GenoType MTBDRplus**, and **GenoType MTBDRsl**), transfer 500 µl of decontaminated sample material into a labeled 1.5 ml screw cap tube; when using bacteria grown in liquid medium (only **GenoType MTBC**, **GenoType MTBDRplus**, **GenoType MTBDRsl**, **GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0, and **GenoType NTM-DR**), transfer 1 ml.

When using bacteria grown on solid medium (only **GenoType MTBC**, **GenoType MTBDRplus**, **GenoType MTBDRsl**, **GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0, and **GenoType NTM-DR**), collect bacteria with an inoculation loop and suspend in 100 µl of Lysis Buffer (A-LYS), vortex, and continue with step 4.

2. Centrifuge for 15 min at 10,000 x g.
3. Discard supernatant and resuspend pellet in 100 µl Lysis Buffer (A-LYS) by vortexing.
4. Incubate sample for 5 min at 95°C in a water bath. Briefly spin down.
5. Add 100 µl Neutralization Buffer (A-NB) and vortex sample for 5 sec.
6. Spin down for 5 min at full speed in a table top centrifuge and directly use 5 µl of the supernatant for PCR.
In case the DNA solution is to be stored for an extended period of time, transfer supernatant to a new tube.

The extracted DNA may directly be used for downstream applications or can be stored at -20°C.

B. For use with the GenoQuick® CT assay:

If a negative control sample for detection of possible contamination events shall be included in DNA extraction, pipette 100 µl Lysis Buffer (A-LYS) into a 1.5 ml screw cap tube. For further processing the negative control, proceed with step 4.

1. When using swabs with transport medium, rinse out swab in transport medium by vortexing for 10 seconds. Squeeze out any residual liquid at the inner wall of the tube. Discard swab.
When using dry swabs, rinse out swab in 0.5-1 ml 0.9% NaCl solution by vortexing for 10 seconds. Squeeze out any residual liquid at the inner wall of the tube. Discard swab.
2. Transfer 500 µl of sample material from step 1 or 500 µl of first void urine into a labeled 1.5 ml screw cap tube. Centrifuge for 15 min at 10,000 x g in a standard table top centrifuge.
3. Discard supernatant and resuspend pellet in 100 µl Lysis Buffer (A-LYS) by vortexing.
4. Incubate sample for 5 min at 95°C in a water bath. Briefly spin down.
5. Add 100 µl Neutralization Buffer (A-NB) and vortex sample for 5 sec.
6. Directly use 5 µl of the DNA solution for PCR.
In case the DNA solution is to be stored for an extended time period, spin down for 5 min at full speed and transfer supernatant to a new tube.

The extracted DNA may directly be used for downstream applications or can be stored at –20°C.

C. For use with the GenoType CMdirect, GenoType Mycobacterium AS, or GenoType Mycobacterium CM VER 2.0 assay:

Handling of potentially infectious specimens must be carried out in a class II safety cabinet. Potentially infectious samples must be centrifuged in a class II safety cabinet or in an aerosol-tight rotor. Open aerosol-tight rotor in safety cabinet only. For inactivated samples, a standard rotor can be used for centrifugation outside the safety cabinet.

Determine the number of samples (number of samples to be analyzed plus negative control sample). Prepare an A-LYS/IC mix containing 100 µl Lysis Buffer (A-LYS) and 2 µl Internal Control DNA (IC GT CMdirect for the **GenoType CMdirect**, IC GT Mycobacterium AS for the **GenoType Mycobacterium AS**, or IC GT Mycobacterium CM VER 2.0 for the **GenoType Mycobacterium CM VER 2.0**; included in the respective **GenoType** kit) for each sample. Mix the A-LYS/IC mix thoroughly (vortex).

If a negative control sample for detection of possible contamination events shall be included in DNA extraction, pipette 100 µl A-LYS/IC mix into a 1.5 ml screw cap tube. For further processing the negative control, proceed with step 4.

1. When using patient specimens (only **GenoType CMdirect**), transfer 500 µl of decontaminated sample material into a labeled 1.5 ml screw cap tube; when using bacteria grown in liquid medium (only **GenoType Mycobacterium AS** and **GenoType Mycobacterium CM VER 2.0**), transfer 1 ml.
When using bacteria grown on solid medium (only **GenoType Mycobacterium AS** and **GenoType Mycobacterium CM VER 2.0**), collect bacteria with an inoculation loop and suspend in 100 µl A-LYS/IC mix, vortex, and continue with step 4.
2. Centrifuge for 15 min at 10,000 x g.
3. Discard supernatant and resuspend pellet in 100 µl A-LYS/IC mix by vortexing.
4. Incubate sample for 5 min at 95°C in a water bath. Briefly spin down.
5. Add 100 µl Neutralization Buffer (A-NB) and vortex sample for 5 sec.
6. Spin down for 5 min at full speed in a table top centrifuge and directly use 5 µl of the supernatant for PCR.
In case the DNA solution is to be stored for an extended period of time, transfer supernatant to a new tube.

The extracted DNA may directly be used for downstream applications or can be stored at –20°C.

Limitations

Strictly adhere to the established protocols and procedures in order to obtain correct test results and to avoid contaminations.

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

The performance evaluation of the **GenoLyse®** kit was carried out with compatible test kits from Hain Lifescience, applying the conditions indicated in the respective instructions for use. The starting materials included in the respective instructions for use were tested. Until the present edition of the instructions on hand, the performance of the extraction method has not been validated with other test kits or other sample materials. Performance data can be requested through www.hain-lifescience.com

The results generated with DNA extracted with this kit may only be interpreted in conjunction with additional laboratory and clinical data available to the responsible physician.

This kit was not evaluated for DNA extraction from stool samples or blood as well as swab media containing inhibitors of PCR (e.g. alcohols, SDS). The kit was neither validated for extraction from fungi, parasites or viruses nor for extraction of RNA.

Troubleshooting

Problems in subsequent applications (e.g. amplification problems)

- DNA solution contains inhibitors. Ensure appropriate starting material.
- DNA solution contains protein contaminations. Include or extend centrifugation step of neutralized cell lysate and transfer supernatant to a new tube.
- Improper sampling, storage, transport, or preparation of specimen. Request new specimen and repeat DNA extraction.
- Contamination of extraction reagents. In the subsequent application, species-specific DNA is also detected in a negative control included in the DNA extraction (see chapter Quality Control). Repeat extraction with new reagents.

Material Required but not Included in the Kit

- 0.9% sodium chloride solution (for protocol **B**)
- 1.5 ml screw cap tubes
- Adjustable pipettes for 20, 200, and 1000 µl
- Class II safety cabinet (for protocols **A** and **C**)
- Disposable gloves
- Disposable sterile pipette tips with filter
- Table top centrifuge, if applicable with aerosol-tight rotor
- Timer
- Vortexer
- Water bath, precision $\pm 1^{\circ}\text{C}$

Kit Contents

Order no.	51612	51610
Extractions	12	96
Lysis Buffer (A-LYS) contains <1% nonionic tenside, <0.2% NaOH, dye	1.2 ml	9.6 ml
Neutralization Buffer (A-NB) contains buffer	1.2 ml	9.6 ml
Instructions for use	1	1

Ordering Information

	Order no.
GenoLyse [®] (kit for manual DNA extraction of 12 samples)	51612
GenoLyse [®] (kit for manual DNA extraction of 96 samples)	51610

References

1. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th edition. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 2009.
2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards), USA, Document M29 (please refer to the latest version).

Important Changes in IFU-51610-14

Chapter	Change
Intended Use, Procedure	The GenoLyse [®] kit can also be used with the new GenoType CMdirect kit.



Hain Lifescience GmbH

Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany
www.hain-lifescience.de, +49 (0) 74 73- 94 51- 0

GenoLyse[®]

VER 1.0

Руководство к пользованию

IFU-51610-14

CE

IVD

только для диагностики in vitro

2017-09-18



Пожалуйста, перед тем как начать работу с набором, внимательно изучите всю инструкцию по применению. Чтобы получить правильные результаты тестирования, строго придерживайтесь установленной процедуры.

Предназначение

Набор **GenoLyse®** DNA extraction позволяет быстро и легко выполнять мануальное выделение бактериальной ДНК для дальнейшего использования с ниже перечисленными диагностическими наборами от Hain Lifescience: **GenoQuick® CT**, **GenoQuick® MTB**, **GenoType CMdirect**, **GenoType MTBC**, **GenoType MTBDRplus**, **GenoType MTBDRsl**, **GenoType Mycobacterium AS**, **GenoType Mycobacterium CM** и **GenoType NTM-DR**.

В зависимости от последовательности теста, в качестве исходного материала можно использовать образец пациента и/или культивированный материал.

Данный набор только для диагностики in vitro и предназначен для использования в медицинских лабораториях.

Принцип тестирования

Весь ход работы подразделяется на три этапа: (i) осаждение клеток для удаления жидкости из образца, (ii) лизис в щелочной среде и при повышенной температуре, и (iii) нейтрализация. Выделенную ДНК можно использовать непосредственно для дальнейшей работы, или можно хранить при –20°C.

Хранение и утилизация компонентов набора

Все компоненты набора хранить при температуре от 2°C до 8°C. После окончания срока годности, реактивы не использовать. Утилизация и уничтожение неиспользованных реагентов должны происходить в строгом соответствии с федеральными, государственными и местными законами.

Меры предосторожности при работе с компонентами набора

Необходимо соблюдать федеральные, государственные и местные законы безопасности труда и охраны окружающей среды. Всегда использовать защитную одежду и перчатки.

Для получения дополнительной информации, пожалуйста, обратитесь к материалам по безопасности работы, которые можно загрузить с сайта: www.hain-lifescience.com/products/msds.html

Требования к образцу

Применимые стартовые материалы для диагностического набора (**GenoQuick® CT**, **GenoQuick® MTB**, **GenoType CMdirect**, **GenoType MTBC**, **GenoType MTBDRplus**, **GenoType MTBDRsl**, **GenoType Mycobacterium AS**, **GenoType Mycobacterium CM** или **GenoType NTM-DR**) перечислены в соответствующих инструкциях.

Придерживайтесь данной инструкции для хранения, транспортировки и подготовки образцов, а так же следуйте специальным предупреждениям при работе.

Меры предосторожности при работе с образцами

Образцы от пациентов и культуры, полученные из образцов пациентов, всегда должны рассматриваться, как потенциально инфекционные, и работать с ними следует соответственным образом (см. [1] или [2]). Всегда использовать защитную одежду и перчатки. Образцы от пациентов из группы риска (инфицированные патогенными микроорганизмами, включая гепатит Б и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)) и культуры, полученные из этих образцов, всегда должны быть промаркированы, и работать с ними необходимо, соблюдая все меры предосторожности, согласно принятым в данном институте правилам.

Сразу же после использования выбросьте отработанные наконечники пипеток в контейнер для биологически опасных отходов. По окончании исследования, выбросьте все отработанные материалы в контейнер для биологически опасных отходов.

Контроль качества

Соблюдайте обычные меры предосторожности при выделении нуклеиновых кислот. Особенно важно, чтобы все реагенты и материалы, используемые для выделения ДНК и проведения амплификации, не содержали ДНК-аз.

Для выявления случаев возможной контаминации следует использовать включенный в набор отрицательный контроль для каждого образца на этапе экстракции ДНК. Подготовка отрицательных контролей описана в главе Ход работы.

Ход работы

А. Для использования с наборами GenoQuick® MTB, GenoType MTBC, GenoType MTBDRplus, GenoType MTBDRsl, GenoType Mycobacterium CM VER 1.0 или GenoType NTM-DR:

Обработку потенциально инфекционных образцов надо проводить в вытяжном шкафу II класса безопасности. Потенциально инфекционные образцы нужно центрифугировать в безопасном боксе 2-го класса или с применением аэрозоль-непроницаемого ротора. Аэрозоль-непроницаемый ротор можно открывать исключительно в безопасном боксе. Стандартный ротор подойдёт для центрифугирования инактивированных образцов вне безопасного бокса.

Если для выявления возможных случаев контаминации, при выделении ДНК должен быть включён отрицательный контрольный образец, пипетируйте 100 µл Лизирующего Буфера (A-LYS) в 1,5 мл пробирки с прикручивающимися крышками. Для дальнейшей обработки отрицательного контроля, продолжайте ход работы с шага 4.

1. При использовании образцов пациента (только **GenoQuick® MTB**, **GenoType MTBDRplus** и **GenoType MTBDRsl**), перенесите 500 µл деконтаминированного образца в помеченную пробирку на 1,5 мл с прикручивающейся крышкой; при использовании бактериального материала, проросшего на жидкой среде (только **GenoType MTBC**, **GenoType MTBDRplus**, **GenoType MTBDRsl**, **GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0 и **GenoType NTM-DR**), перенесите 1 мл.
При использовании бактериального материала, проросшего на плотной среде (только **GenoType MTBC**, **GenoType MTBDRplus**, **GenoType MTBDRsl**, **GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0, и **GenoType NTM-DR**), соберите бактерии при помощи инокуляционной петли и суспендируйте в 100 µл Лизирующего Буфера (A-LYS), вортиксите и продолжайте с этапа 4.
2. Центрифугируйте в течение 15 минут при 10 000 x g.
3. Удалите супернатант и ресуспендируйте на вортке в 100 µл Лизирующего Буфера (A-LYS).
4. Инкубируйте образец в течение 5 минут при 95°C на водяной бане. Быстро осадите.
5. Добавьте 100 µл Нейтрализующего Буфера (A-NB) и вортиксите образец в течение 5 секунд.
6. Осадите в течение 5 минут при максимальной скорости на настольной центрифуге и используйте для ПЦР непосредственно 5 µл супернатанта. В случае, если раствор ДНК подлежит хранению на более продолжительный период, перенесите супернатант в новую пробирку.

Выделенную ДНК можно использовать непосредственно для исследований, или можно хранить при –20°C.

В. Для работы с набором GenoQuick® CT:

Если для выявления возможных случаев контаминации, при выделении ДНК должен быть включён отрицательный контрольный образец, пипетируйте 100 µл Лизирующего Буфера (A-LYS) 1,5 мл пробирки с прикручивающимися крышками. Для дальнейшей обработки отрицательного контроля, продолжайте ход работы с шага 4.

1. При использовании мазков с транспортной средой, смойте мазок в транспортную среду при вортиксировании в течение 10 секунд. Отожмите остатки жидкости о внутреннюю стенку пробирки. Удалите мазок.
При использовании сухих мазков, смойте мазок в 0,5-1 мл 0,9% раствора NaCl при вортиксировании в течение 10 секунд. Отожмите остатки жидкости о внутреннюю стенку пробирки. Удалите мазок.
2. Перенесите 500 µл материала образца из шага 1 или 500 µл первой порции мочи в помеченную пробирку на 1,5 мл с прикручивающейся крышкой. Центрифугируйте в течение 15 минут при 10 000 x g в стандартной настольной центрифуге.
3. Удалите супернатант и на вортке ресуспендируйте осадок в 100 µл Лизирующего Буфера (A-LYS).
4. Инкубируйте образец в течение 5 минут при 95°C на водяной бане. Быстро осадите.
5. Добавьте 100 µл Нейтрализующего Буфера (A-NB) и вортиксите образец в течение 5 секунд.
6. Для ПЦР используйте непосредственно 5 µл раствора ДНК. В случае, если предполагается длительное хранение раствора ДНК, осадите в течение 5 минут на максимальной скорости и перенесите супернатант в новую пробирку.

Выделенную ДНК можно использовать непосредственно для исследований, или можно хранить при –20°C.

С. Для работы с набором GenoType CMdirect, GenoType Mycobacterium AS или GenoType Mycobacterium CM VER 2.0:

Обработку потенциально инфекционных образцов надо проводить в вытяжном шкафу II класса безопасности. Потенциально инфекционные образцы нужно центрифугировать в безопасном боксе 2-го класса или с применением аэрозоль-непроницаемого ротора. Аэрозоль-непроницаемый ротор можно открывать исключительно в безопасном боксе. Стандартный ротор подойдёт для центрифугирования инактивированных образцов вне безопасного бокса.

Определите количество образцов (количество анализируемых проб + отрицательный контрольный образец). Подготовьте смесь A-LYS/IC состоящую из 100 µл Лизирующего Буфера (A-LYS) и 2 µл Внутреннего Контроля ДНК (IC GT CMdirect для работы с набором **GenoType CMdirect**, IC GT Mycobacterium AS для работы с набором **GenoType Mycobacterium AS** или IC GT Mycobacterium CM VER 2.0 для работы с набором **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0; включён в соответствующий набор **GenoType kit**) из расчёта на каждый образец. Тщательно перемешайте смесь A-LYS/IC (можно на вортке).

Если для выявления возможных случаев контаминации, при выделении ДНК должен быть включён отрицательный контрольный образец, пипетируйте 100 µл смеси A-LYS/IC в 1,5 мл пробирки с прикручивающимися крышками. Для дальнейшей обработки отрицательного контроля, продолжайте ход работы с шага 4.

1. При использовании образцов пациента (только **GenoType CMdirect**), перенесите 500 µл деконтаминированного образца в помеченную пробирку на 1,5 мл с прикручивающейся крышкой; при использовании бактериального материала, проросшего на жидкой среде (только **GenoType Mycobacterium AS** и **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0), перенесите 1 мл.
При работе с бактериями, выросшими на плотной среде (только **GenoType Mycobacterium AS** и **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0), соберите бактерии при помощи инокуляционной петли и суспендируйте в 100 µл смеси A-LYS/IC, вортиксите и продолжайте с этапа 4.
2. Центрифугируйте в течение 15 минут при 10 000 x g.
3. Удалите супернатант и ресуспендируйте на вортке в 100 µл смеси A-LYS/IC.
4. Инкубируйте образец в течение 5 минут при 95°C на водяной бане. Быстро осадите.
5. Добавьте 100 µл Нейтрализующего Буфера (A-NB) и вортиксите образец в течение 5 секунд.
6. Используя настольную центрифугу, осадите на максимальной скорости 5 мин, и отобрать 5 мкл супернатанта для ПЦР. Если предполагается более длительное хранение раствора ДНК, то супернатант необходимо перенести в новую пробирку.

Выделенную ДНК можно использовать непосредственно для исследований, или можно хранить при –20°C.

Ограничения метода

Чтобы получить правильные результаты и избежать контаминации, строго придерживайтесь установленного протокола и процедуры тестирования. Этот тест может проводиться только обученным и подготовленным высококвалифицированным персоналом, который знаком с молекулярно-биологическими методами.

Оценка эффективности набора **GenoLyse®** проводилась только с использованием совместимого набора от Hain Lifescience, и в условиях, указанных в соответствующей инструкции для пользователя. Исходные материалы, включённые в соответствующие инструкции по применению были протестированы. До появления данной редакции рабочей инструкции, описание метода выделения не было валидировано на других наборах или с другими материалами в качестве образца. Технические характеристики можно запросить по ссылке: www.hain-lifescience.com

Результаты, полученные для ДНК, выделенной при помощи этого набора, можно интерпретировать только в сочетании с дополнительными лабораторными исследованиями и клинической картиной, полученной от ответственного врача.

Данный набор не оценивался для выделения ДНК из образцов стула или крови, а так же для мазков, содержащих ингибиторы ПЦР (например, спирты, СДС). Так же этот набор не был валидирован ни для выделения из грибов, паразитов или вирусов, ни для выделения РНК.

Решение проблем

Проблемы при последующих применениях (например, проблемы при амплификации)

- Раствор ДНК содержит ингибиторы. Убедитесь в качестве исходного материала.
- Раствор ДНК содержит белковые примеси. Добавьте или увеличьте этап центрифугирования лизата нейтрализованных клеток, и перенесите супернатант в новую пробирку.
- Неправильное взятие образца, его хранение и транспортировка, или неправильная подготовка образца. Запросите новый образец и повторите выделение.
- Контаминация реагентов для выделения. При последующем применении, ДНК так же выявляется в отрицательном контроле, включённом в выделение ДНК (см. Главу Контроль качества). Повторите выделение с новыми реагентами.

Необходимые, но не поставляемые материалы

- 0,9% раствор хлорида натрия (для протокола **B**)
- Микропипетки на 20, 200 и 1000 мкл
- Вытяжной шкаф 2-го класса безопасности (для протоколов **A** и **C**)
- Одноразовые перчатки
- Одноразовые стерильные наконечники с фильтром
- Таймер
- Настольная центрифуга (желательно с аэрозольной защитой)
- Вортекс
- Водяная баня, точность $\pm 1^{\circ}\text{C}$
- 1,5 мл пробирки с прикручивающимися крышками

Состав набора

Номер для заказа	51612	51610
Количество выделений	12	96
Лизирующий Буфер (A-LYS) содержит неионогенное активное вещество <1%, <0,2% NaOH, краситель 1,2 мл		9,6 мл
Нейтрализующий Буфер (A-NB) содержит буфер	1,2 мл	9,6 мл
Руководство к пользованию	1	1

Информация для заказа

	Номер для заказа
GenoLyse® (набор для ручного выделения ДНК, рассчитанный на 12 образцов)	51612
GenoLyse® (набор для ручного выделения ДНК, рассчитанный на 96 образцов)	51610

Список литературы

1. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th edition. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 2009.
2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards), USA, Document M29 (please refer to the latest version).

Важные изменения в инструкции IFU-51610-14

Глава	Изменения
Предназначение, Ход работы	Набор GenoLyse® был утверждён для использования вместе с наборами GenoType CMdirect .



51610-14-08



Hain Lifescience GmbH

Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany
www.hain-lifescience.de, +49 (0) 74 73- 94 51- 0

GenoType MTBDR*plus*

VER 2.0

Instructions for Use

IFU-304A-09

CE

IVD

for in vitro diagnostic use only

2019-04-25



GenoType MTBDRplus VER 2.0

Molecular Genetic Assay for Identification of the *M. tuberculosis* Complex and its Resistance to Rifampicin and Isoniazid from Clinical Specimens and Cultivated Samples

Please read the instructions on hand completely and carefully before using the kit. Strictly adhere to the established procedure to obtain correct test results.

Intended Use

The **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 is a qualitative in vitro test for the identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampicin (RMP) and/or isoniazid (INH) from pulmonary smear-positive or -negative clinical specimens and cultivated samples. The following species are included in the tuberculosis (TB)-causing *M. tuberculosis* complex: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. canettii*, and *M. pinnipedii*. The identification of RMP resistance is enabled by the detection of the most significant associated mutations of the *rpoB* gene (coding for the β -subunit of the RNA polymerase). For detection of INH resistance, the *katG* gene (coding for the catalase peroxidase) and the promoter region of the *inhA* gene (coding for the NADH-enoyl-ACP reductase) are examined.

The test is indicated as an aid for diagnosis and intended for use in medical laboratories.

Summary and Explanation

Tuberculosis (TB) is a bacterial infectious disease passed on by droplet infection. In 2017, there were an estimated 10.0 million incident cases of TB globally, and an estimated 1.3 million TB deaths [1]. TB treatment requires a therapy over several months. Emergence and spread of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) is a major medical and public problem threatening global health. MDR-TB is defined as TB that is resistant at least to RMP and INH, the two most important first-line anti-TB drugs [2]. MDR-TB is a challenge to TB control due to its complex diagnosis and obstacles in treatment. In 2013, there were an estimated 480,000 cases of MDR-TB among the world's 11 million prevalent cases of TB [1].

As long as MDR-TB is not verified, use of inadequate and hence ineffective antibiotics may lead to further spread of resistant bacteria and amplification of resistance. Therefore, rapid diagnosis and identification of MDR-TB is a prerequisite for appropriate treatment.

Principles of the Procedure

The **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 is based on the **DNA•STRIP** technology. The whole procedure is divided into three steps: (i) DNA extraction from clinical specimens (pulmonary, decontaminated) or cultured material (solid/liquid medium) – the necessary reagents are not included in the kit, (ii) a multiplex amplification with biotinylated primers, and (iii) a reverse hybridization.

All reagents needed for amplification, such as polymerase and primers, are included in the Amplification Mixes A and B (AM-A and AM-B) and are optimized for this test. The membrane strips are coated with specific probes complementary to the amplified nucleic acids. After chemical denaturation, the single-stranded amplicons bind to the probes (hybridization). Highly specific binding of complementary DNA strands is ensured by stringent conditions which result from the combination of buffer composition and a certain temperature. Thus, the probes reliably discriminate several sequence variations in the gene regions examined. The streptavidin-conjugated alkaline phosphatase binds to the amplicons' biotin via the streptavidin moiety. Finally, the alkaline phosphatase transforms an added substrate into a dye which becomes visible on the membrane strips as a colored precipitate. A template ensures the easy and fast interpretation of the banding pattern obtained.

Reagents and Instruments

Kit contents

Order no.	304A	30496A
Tests	12	96
Kit Component 1 of 2 (store at 2°C to 8°C)		
Membrane strips coated with specific probes (MTBDRplus VER 2.0 STRIPS)	12	2x 48
Denaturation Solution (DEN) contains <2% NaOH, dye	240 μ l	2x 960 μ l
Hybridization Buffer (HYB) contains <10% anionic tenside, dye	12 ml	96 ml
Stringent Wash Solution (STR) contains >25% of a quaternary ammonium compound, <1% anionic tenside, dye	12 ml	96 ml
Rinse Solution (RIN) contains buffer, <1% NaCl, <1% nonionic tenside	36 ml	3x 96 ml
Conjugate Concentrate (CON-C) contains streptavidin-conjugated alkaline phosphatase, dye	120 μ l	960 μ l
Conjugate Buffer (CON-D) contains buffer, 1% blocking reagent, <1% NaCl	12 ml	96 ml
Substrate Concentrate (SUB-C) contains <70% dimethyl sulfoxide, <10% 4-nitro blue tetrazolium chloride, <10% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate	120 μ l	960 μ l
Substrate Buffer (SUB-D) contains buffer, <1% MgCl ₂ , <1% NaCl	12 ml	96 ml
Tray, evaluation sheet	1 of each	4 of each
Instructions for use, template	1 of each	1 of each
Lot label	3	3

Kit Component 2 of 2 [store at –20°C to –18°C]

Amplification Mix A (AM-A GT MTBDRplus VER 2.0) contains buffer, nucleotides, Taq polymerase	120 µl	4x 240 µl
Amplification Mix B (AM-B GT MTBDRplus VER 2.0) contains salts, specific primers, dye	420 µl	4x 840 µl

Storage, handling, and disposal of kit constituents

1/2 Kit Component 1 of 2

2/2 Kit Component 2 of 2

Store all constituents from Kit Component 1 at 2°C to 8°C. Store all constituents from Kit Component 2 at –20°C to –18°C and keep strictly separated from contaminating DNA. Avoid repeated (>4x) freezing and thawing of AM-A and AM-B; when processing only small sample numbers per run, aliquot AM-A and AM-B using suitable screw cap tubes (recommendation: see chapter Ordering Information). Do not use the reagents beyond their expiry date. Dispose of unused reagents and waste in accordance with federal, state, and local regulations.

Precautions for handling kit constituents

Observe all federal, state, and local safety and environmental regulations. Always wear suitable protective clothing and gloves. When handling kit reagents, the following special safety measures must be applied:

Hybridization Buffer (**HYB**) and Substrate Concentrate (**SUB-C**) are not classified as hazardous. Due to their ingredients, however, hazard statement EUH210 applies: Safety data sheet available on request.



Denaturation Solution (**DEN**) contains <2% sodium hydroxide.

Warning!

H315: Causes skin irritation. H319: Causes serious eye irritation.

P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection. P305+351+338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. P313: Get medical advice/attention.

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

Conjugate Concentrate (**CON-C**) and Conjugate Buffer (**CON-D**) contain biological material. Hence, they must be considered as potentially infectious and must be handled accordingly [e.g. see [3] or [4]].

Materials required but not included in the kit

- 0.5 ml Screw cap tubes or 1.5 ml screw cap tubes for aliquots (Sarstedt, Nümbrecht, Germany, see chapter Ordering Information)
- Absorbent paper
- Adjustable pipettes for 10, 20, 200, and 1000 µl
- Disposable gloves
- Disposable sterile pipette tips with filter
- DNA extraction kit (**GenoLyse**® or **GXT DNA/RNA Extraction Kit**, see chapter Ordering Information) as well as necessary equipment
- Graduated cylinder
- PCR tubes, DNase and RNase free
- Reagents for cultivation of mycobacteria as well as necessary equipment (when cultivated samples are to be used)
- Sample decontamination reagents as well as necessary equipment
- Shaking water bath + shaking platform **or** **TwinCubator** (instrument for manual hybridization) **or** automated hybridization instrument
- Thermal cycler
- Timer
- Tweezers
- Water (distilled)
- Water (molecular biology grade, for negative controls)

Quality Control

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

- a Conjugate Control zone (CC) to check the binding of the conjugate on the strip and a correct chromogenic reaction
- an Amplification Control zone (AC) 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

Observe the usual precautions for amplification setup. It is essential that all materials (such as pipette tips) coming in contact with the reagents are free from DNases.

Do not interchange or pool Amplification Mixes or membrane strips from different kits unless the lots are identical. You can find the kit lot and the corresponding lots of the kit constituents on the lot labels included in the kit.

A negative control sample for detection of possible contamination events containing water (molecular biology grade) instead of DNA should be part of each test run; the respective test strip should show the bands CC and AC only.

Specimen Requirements

Decontaminated pulmonary smear-positive or -negative patient specimens such as sputum (induction or expectoration), bronchial material (e.g. bronchoalveolar lavages), or aspirates (e.g. pleural aspirate) as well as cultivated samples (solid/liquid medium) can be used as starting material for DNA extraction. Until the present edition of the instructions on hand, the performance of the test has not been validated with other sample materials than those mentioned above.

Precautions for handling specimens

Patient specimens and cultures made from patient specimens must always be considered as infectious and must be handled accordingly (e.g. see [3] or [4]). Always wear suitable protective clothing and gloves. Samples from patients at risk (infected by pathogenic microorganisms or viruses including Hepatitis B and Human Immunodeficiency Virus (HIV)) and cultures made from those samples must always be labeled and handled under suitable safety conditions according to institutional guidelines.

All specimens that may contain mycobacteria should be handled applying Biosafety Level 2 practices or, when indicated, Biosafety Level 3 practices (e.g. see [3]). Observe all federal, state, and local safety regulations.

Discard used pipette tips immediately after use in a container for biohazardous waste. After finishing the assay, discard all used disposables in a container for biohazardous waste.

Storage and transport

All specimens should be collected and transported as recommended in the CDC publication "Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory" [5], the "Clinical Microbiology Procedures Handbook" [6], or your laboratory procedure manual.

It must be ensured that until decontamination, specimens are kept in sterile plastic containers at a temperature of 2°C to 8°C. The transport of specimens at room temperature has to be carried out as soon as possible and should be done within 1-2 days [7,8]. Specimens used for decontamination must not be older than 4 days.

After decontamination and subsequent resuspension of the bacteria pellet with phosphate buffer, samples can be stored at -20°C or -80°C for a maximum of 5 days until performing DNA extraction.

Preparation

Clinical specimens must be processed using the NALC-NaOH method according to the CDC publication "Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory" [5]. After decontamination, the cell pellet should be resuspended in a maximum of 1 to 1.5 ml of phosphate buffer. When testing patient specimens, higher volumes might hamper the sensitivity of the test. Due to the potential inhomogeneity of the specimen, the decontaminated sample must be mixed before removing the aliquot to be analyzed; otherwise the sensitivity of the test might be influenced.

When the sample is to be cultivated, cultivation can be performed either on solid medium (e.g. Loewenstein-Jensen, Middlebrook) or in liquid medium (e.g. MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)).

Handling of potentially infectious specimens must be carried out in a class II safety cabinet.

DNA Extraction

Decontaminated patient samples as well as bacteria grown on solid medium (e.g. Loewenstein-Jensen, Middlebrook) or in liquid medium (e.g. MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)) may be used as starting material for DNA extraction.

For DNA extraction from NALC-NaOH-decontaminated clinical specimens or cultured material the **GenoLyse**® kit (see chapter Ordering Information) is used. For automated DNA extraction from patient specimens, also the **GenoXtract**® in combination with the **GXT DNA/RNA Extraction Kit** (see chapter Ordering Information) can be used. For handling instructions, please refer to the respective instructions for use.

The methods mentioned here were used for performance evaluation of the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0. Until the present edition of the instructions on hand, the performance of the test has not been validated with other DNA extraction methods.

Amplification

All reagents needed for amplification, such as polymerase and primers, are included in the Amplification Mixes A and B (AM-A and AM-B) and are optimized for this test. Thaw AM-A and AM-B shortly before preparing the master mix, spin down briefly, and mix carefully by pipetting up and down.

Pipette AM-A and AM-B only in a room free from contaminating DNA. To avoid contamination, the DNA solution must be added in a separate working area.

Prepare for each sample:

After DNA extraction with **GenoLyse**®

- 10 µl AM-A (see Kit Component 2)
- 35 µl AM-B (see Kit Component 2)
- 5 µl DNA solution

Final volume: 50 µl

After DNA extraction with **GXT DNA/RNA Extraction Kit**

- 10 µl AM-A (see Kit Component 2)
- 35 µl AM-B (see Kit Component 2)
- 10 µl DNA solution

Final volume: 55 µl

Determine the total number of samples (number of samples to be analyzed plus control samples). Prepare the number of tubes needed. Prepare a master mix containing AM-A and AM-B and mix carefully but thoroughly (do not vortex). Alternatively, the content of an AM-A reaction tube may completely be transferred to an AM-B reaction tube. This will lead to master mix sufficient for 12 amplification reactions (12 tests kit) or for 4x 24 amplification reactions (96 tests kit). Please note that the master mix needs to be prepared freshly each time and needs to be processed quickly. Aliquot 45 µl into each of the prepared PCR tubes and add 5 or 10 µl water (molecular biology grade) to one aliquot (negative control sample). In a separate working area, add 5 or 10 µl DNA solution to each aliquot (except for negative control).

Amplification profile:

When using a thermal cycler from Hain Lifescience with the respective preinstallation, select protocol "MDR DIR" for clinical specimens or protocol "MDR CUL" for cultivated samples.

		Clinical specimens	Cultivated samples
15 min	95°C	1 cycle	1 cycle
30 sec	95°C	20 cycles	10 cycles
2 min	65°C		
25 sec	95°C	30 cycles	20 cycles
40 sec	50°C		
40 sec	70°C		
8 min	70°C	1 cycle	1 cycle
Heating rate		≤2.2°C/sec	≤2.2°C/sec

The heated lid must be switched on during the entire program.

Amplification products can be stored at -20°C to +8°C.

Hybridization

When using a hybridization instrument from Hain Lifescience, please refer to the document "Overview equipment programs" available on www.hain-lifescience.com for the name of the hybridization protocol to be used.

The following protocol describes the manual hybridization using a water bath or a **TwinCubator**.

Preparation

Prewarm shaking water bath to **45°C** (the maximum tolerated deviation from the target temperature is +/-1°C) or switch on **TwinCubator**. Prewarm solutions HYB and STR to 37°C to 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 solution. 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, i.e. the time until the bands are clearly visible, 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 as soon as bands are clearly visible 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 included in the kit. 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. For technical reasons the distances between single probes on the strips may vary slightly. **For an accurate evaluation therefore please use the provided template and align it – separately for each locus – with the respective Locus Control band.** Determine the resistance status and note down in the respective column. As a help for interpretation, evaluation examples are given in the subsequent chapter. Each strip has a total of 27 reaction zones (see figure).

.....	————	Conjugate Control (CC)
.....	————	Amplification Control (AC)
.....	————	<i>M. tuberculosis</i> complex (TUB)
.....	————	<i>rpoB</i> Locus Control (<i>rpoB</i>)
.....	————	<i>rpoB</i> wild type probe 1 (<i>rpoB</i> WT1)
.....	————	<i>rpoB</i> wild type probe 2 (<i>rpoB</i> WT2)
.....	————	<i>rpoB</i> wild type probe 3 (<i>rpoB</i> WT3)
.....	————	<i>rpoB</i> wild type probe 4 (<i>rpoB</i> WT4)
.....	————	<i>rpoB</i> wild type probe 5 (<i>rpoB</i> WT5)
.....	————	<i>rpoB</i> wild type probe 6 (<i>rpoB</i> WT6)
.....	————	<i>rpoB</i> wild type probe 7 (<i>rpoB</i> WT7)
.....	————	<i>rpoB</i> wild type probe 8 (<i>rpoB</i> WT8)
.....	————	<i>rpoB</i> mutation probe 1 (<i>rpoB</i> MUT1)
.....	————	<i>rpoB</i> mutation probe 2A (<i>rpoB</i> MUT2A)
.....	————	<i>rpoB</i> mutation probe 2B (<i>rpoB</i> MUT2B)
.....	————	<i>rpoB</i> mutation probe 3 (<i>rpoB</i> MUT3)
.....	————	<i>katG</i> Locus Control (<i>katG</i>)
.....	————	<i>katG</i> wild type probe (<i>katG</i> WT)
.....	————	<i>katG</i> mutation probe 1 (<i>katG</i> MUT1)
.....	————	<i>katG</i> mutation probe 2 (<i>katG</i> MUT2)
.....	————	<i>inhA</i> Locus Control (<i>inhA</i>)
.....	————	<i>inhA</i> wild type probe 1 (<i>inhA</i> WT1)
.....	————	<i>inhA</i> wild type probe 2 (<i>inhA</i> WT2)
.....	————	<i>inhA</i> mutation probe 1 (<i>inhA</i> MUT1)
.....	————	<i>inhA</i> mutation probe 2 (<i>inhA</i> MUT2)
.....	————	<i>inhA</i> mutation probe 3A (<i>inhA</i> MUT3A)
.....	————	<i>inhA</i> mutation probe 3B (<i>inhA</i> MUT3B)
.....	————	colored marker

Note: The strip is not displayed in original size.

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

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 of the single reactions during amplification. In this case, the test was performed correctly and does not have to be repeated.

When only the CC and AC bands are developed, this represents a valid negative result. A missing AC band in case of a negative test result indicates mistakes during setup and/or performance of the amplification reaction, or presence of amplification inhibitors. In this case, the test result is not valid and the test has to be repeated with the respective sample. In case of overall strong signal intensities but only weak staining or absence of the Amplification Control band, a single wild type band showing significantly weaker staining than the other wild type bands of the respective locus (or Locus Control band for *katG*) is to be considered negative.

M. tuberculosis complex (TUB)

This zone hybridizes with amplicons generated from all members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. If the TUB zone is negative while no evaluable resistance pattern is developed, the tested specimen does not contain bacteria belonging to the *M. tuberculosis* complex and cannot be evaluated by this test system. In rare cases, the TUB zone may be negative while an evaluable resistance pattern is developed. If so, the presence of a strain belonging to the *M. tuberculosis* complex must be suspected and the test should be repeated (see below, "special case" no. 3).

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

The Locus Control zones detect a gene region specific for the respective locus. In case of a positive test result (evaluable wild type and mutation banding pattern), the signals of the Locus Control bands may be weak.

Wild type probes

The wild type probes comprise the most important resistance regions of the respective genes (see figure 1, as well as tables 1, 2, and 3). When all wild type probes of a gene stain positive, there is no detectable mutation within the examined regions. This indicates that the strain tested is sensitive to 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 indicates a resistance of the tested strain to the respective antibiotic.

Each pattern deviating from the wild type pattern indicates a resistance of the tested strain. The banding pattern obtained with the *rpoB* probes allows drawing a conclusion about an RMP resistance of the strain tested, the *katG* and the *inhA* banding pattern about an INH resistance.

Mutation probes

The mutation probes detect some of the most common resistance-mediating mutations (see tables 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.

In rare cases, when the *rpoB* MUT3 band is positive, weak staining may be detected at the *rpoB* WT8 band which is to be considered negative.

Each pattern deviating from the wild type pattern indicates a resistance of the tested strain. The banding pattern obtained with the *rpoB* probes allows drawing a conclusion about an RMP resistance of the strain tested, the *katG* and the *inhA* banding pattern about an INH resistance.

Please note:

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

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

Note the following special cases:

1. There is a possibility that the specimen tested contains a heteroresistant strain. In case of a heteroresistance, a mutated as well as a wild type sequence can be detected in the respective strain; hence, one of the mutation probes as well as the corresponding wild type probe may stain positive on the respective strip. Whether the respective resistance becomes phenotypically evident depends on the ratio of mutated and nonmutated sequences at investigation.
2. There is a possibility that the tested specimen contains more than one *M. tuberculosis* complex 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 stain positive. Whether the respective resistance becomes phenotypically evident, depends on the ratio of resistant and sensitive strain at investigation.
3. There is a possibility that due to a mixed infection the tested specimen contains both an *M. tuberculosis* complex strain and a nontuberculous mycobacterium. In rare cases, the TUB band may be missing due to competition of the single amplification reactions during PCR. However, when an evaluable resistance pattern is developed, the presence of a strain belonging to the *M. tuberculosis* complex must be suspected and the test should be repeated.
4. In rare cases, all bands of a gene locus (including the Locus Control band) may be missing completely on a test strip. If this result is generated from a clinical specimen, possible reasons could be, but are not limited to, a DNA concentration in the sample below the limit of detection or the presence of interfering substances in the sample. Such a banding pattern cannot be evaluated and the test must be repeated.

If a cultivated sample generates a result with the complete *katG* locus missing, this indicates an INH resistance of the strain tested.

Resistance regions and common resistance-mediating mutations

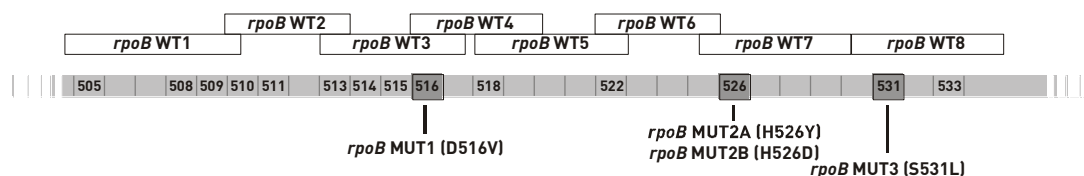


Figure 1: RMP resistance region of the *rpoB* gene

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.

Table 1: Mutations in the *rpoB* gene and the corresponding wild type and mutation bands [according to [9]]

Failing wild type band(s)	Codons analyzed	Developing mutation band	Mutation
<i>rpoB</i> WT1	505-509		F505L T508A S509T
<i>rpoB</i> WT2	510-513		Q510H 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 S531Q* S531W L533P

* These rare mutations have only been detected theoretically (in silico).

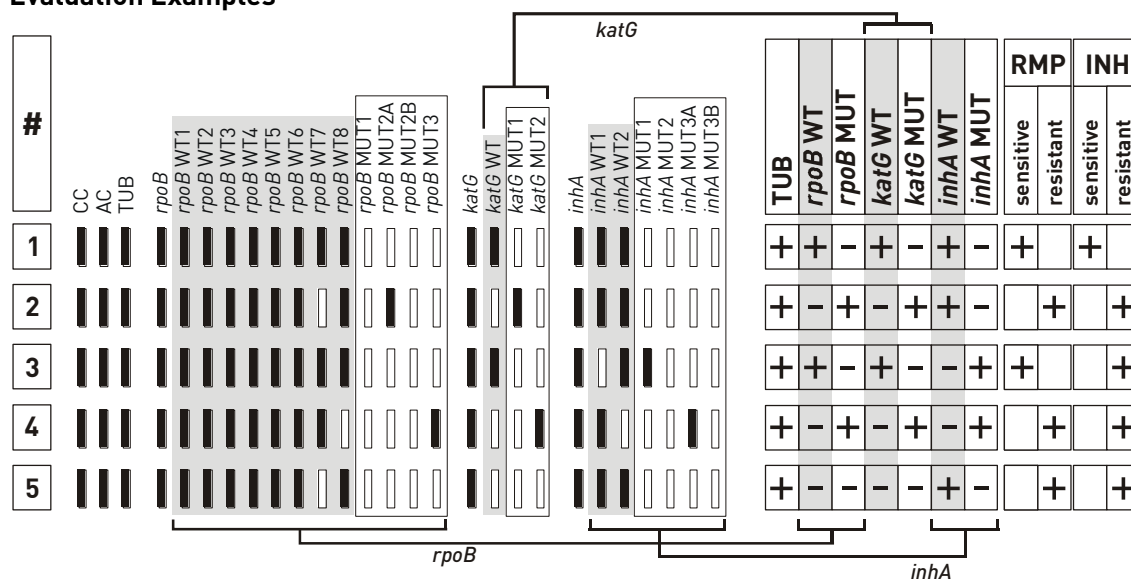
Table 2: Mutations in the *katG* gene and the corresponding wild type and mutation bands

Failing wild type band	Codon analyzed	Developing mutation band	Mutation
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1 <i>katG</i> MUT2	S315T1 S315T2

Table 3: Mutations in the *inhA* promoter region and the corresponding wild type and mutation bands

Failing wild type band	Analyzed nucleic acid position	Developing mutation band	Mutation
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C-15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A-16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T-8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T-8A

Evaluation Examples

**Figure 2:** Examples for banding patterns and their evaluation with respect to RMP and/or INH 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 as "-". Negative entries are only made to the mutation columns when none of the mutation bands displays a coloration. If at least one of the mutation bands displays a coloration, this is classified as positive and the MUT column of the respective gene is marked with a "+".

Below, two of the examples shown above are explicated:

Example 1 shows the wild type banding pattern. All wild type probes, but none of the mutation probes display a signal; hence, the evaluation chart shows "+" in the three wild type columns and "-" in the three mutation columns. Accordingly, the boxes "RMP sensitive" and "INH sensitive" are marked with a "+".

In **example 5**, one of the *rpoB* and the *katG* wild type probes are missing; 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 resistant to RMP and INH.

Limitations

Strictly adhere to the established protocols and procedures in order to obtain correct test results and to avoid contaminations.

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

The test reflects the current state of knowledge of Hain Lifescience.

As any DNA-based assay, this test only screens the nucleic acid sequence and not the amino acid sequence. Therefore, it is possible that mutations in the probe region that do not cause an amino acid exchange (silent mutations) will still produce the absence of one of the wild type bands. A silent mutation in codon 514 of the *rpoB* gene leading to the absence of the *rpoB* WT3 band was observed in rare cases [10]. Hence, if an RMP resistance is detected solely by a missing *rpoB* WT3 band, results of phenotypic drug susceptibility testing should be considered.

Additional mutations within the tested *rpoB* gene region causing RMP resistance have been published [11]. As these mutations are very rare, they were not accessible for validation purposes of this test system but were only detected in silico.

The **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 only detects those resistances 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 RMP and INH resistance mechanisms will not be detected by this test.

Theoretically, a resistance can exist in spite of a wild type pattern. If the sample contains a strain that has developed a heteroresistance and the resistance is caused by a mutation not covered by the mutation probes, the wild type pattern will appear. Similarly, if the sample contains more than one *M. tuberculosis* complex strain (due to mixed culture or contamination) and one of these harbors a mutation not covered by the mutation probes, the wild type pattern will also appear.

As any DNA detection method, the test system on hand detects DNA from viable and nonviable bacteria. Therefore, this test may not be used for monitoring the progression or success of treatment of patients with antimicrobial therapy.

The **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 generates qualitative results. The intensities of the bands on a strip do not give information about the number of cells in a positive sample.

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

The members of the MTB complex cannot be differentiated.

The test only works within the limits of the genomic regions the primers and probes were chosen from.

As any detection system based on hybridization, 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 subtypes might not be detected.

Performance evaluation of this assay was carried out using the **GenoLyse®** kit for DNA extraction from decontaminated pulmonary smear-positive and smear-negative clinical specimens as well as from cultivated samples and using the **GXT DNA/RNA Extraction Kit** for automated DNA extraction from decontaminated clinical specimens. Until the present edition of the instructions on hand, the performance of the test has not been validated with other DNA extraction methods or sample materials.

The results of this test may only be interpreted in combination with additional laboratory and clinical data available to the responsible physician. In addition, results of phenotypic drug susceptibility testing have to be considered in certain cases.

The user must have or acquire information about the local mutation distribution pattern of the genes investigated with this test. Confirmation of the results by phenotypic drug susceptibility testing may be necessary.

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.

Repeat reverse hybridization.

Weak or no signals except for Conjugate Control zone

- Quality of extracted DNA does not allow an efficient amplification. Repeat extraction.
- Amplification Mixes (AM-A and AM-B) were not mixed properly, interchanged, or added in wrong amounts. Prepare a new master mix and repeat amplification.
- Incubation temperature too high. Repeat reverse hybridization.

No homogeneous staining

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

Repeat reverse hybridization.

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.

Repeat reverse hybridization.

Unexpected result

- Wrong incubation temperature.
 - Hybridization Buffer and/or Stringent Wash Solution were not properly prewarmed or mixed.
 - Contamination of neighboring wells by spillage during addition of Hybridization Buffer.
- Repeat reverse hybridization.**
- Contamination of extracted DNA with previously extracted or amplified DNA. Repeat extraction.
 - Contamination of amplification reagents. In this case, a negative control sample shows additional bands besides CC and AC. Repeat amplification using fresh reagents.
 - 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. Re-culture in order to exclude contamination.
 - Improper sampling, storage, transport, or preparation of specimen. Request a new specimen and repeat test.
 - Error during DNA extraction. Repeat extraction.

Ordering Information

Hain Lifescience	Order no.
GenoType MTBDR_{plus} VER 2.0 (kit for analysis of 12 samples)	304A
GenoType MTBDR_{plus} VER 2.0 (kit for analysis of 96 samples)	30496A
GenoLyse® (kit for manual DNA extraction of 12 samples)	51612
GenoLyse® (kit for manual DNA extraction of 96 samples)	51610
GXT DNA/RNA Extraction Kit (kit for automated DNA/RNA extraction of 96 samples using the GenoXtract®)	12.01.02
GenoXtract® (instrument for nucleic acid extraction of up to 12 samples)	8.31.01
Sarstedt, Nümbrecht, Germany	Order no.
0.5 ml Screw cap tubes	72.730.105
1.5 ml Screw cap tubes	72.692.005

Performance Characteristics

Diagnostic performance

Pulmonary clinical specimens

Diagnostic performance characteristics of the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 were determined in a study [12] with 338 specimens (including sputum, bronchoalveolar lavages, and pleural aspirates) compared to culture (successful cultivation on Loewenstein-Jensen solid medium or in MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA) and subsequent speciation using the **GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0) and phenotypic drug susceptibility testing (DST). Additionally, the samples were examined by microscopy. Clinical data of the patients were included in the evaluation.

The study site was located in a high MDR-TB burden country. Microscopy and cultivation methods were conducted on site. Aliquots of the NALC-decontaminated sputum specimens were shipped to a second laboratory to perform DNA extraction and the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0. Manual DNA extraction was performed with the **GenoLyse**® kit (162 of the 338 sputum samples), automated DNA extraction was carried out on the **GenoXtract**® using the **GXT DNA/RNA Extraction Kit** (176 of the 338 sputum samples) according to the respective instructions for use.

A congruent **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 positive, clinical positive result was defined either by positivity of culture and **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 or when only **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 was positive and culture negative, but TB was indicated by previous culture-based findings of the respective patient. A discrepant result (**GenoType MTBDRplus** VER 2.0 positive and culture negative) does not exclude in all cases a TB infection of the patient as for some patients' histories of a probable TB infection were not available.

Table 1: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 for detection of MTBC from pulmonary clinical specimens compared to culture/**GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0 (GT Myco CM) and clinical findings

		Smear-positive				Smear-negative			
		Culture/GT Myco CM and clinic			Sens: 100%	Culture/GT Myco CM and clinic			Sens: 80.3%
		Positive	Negative		Spec: /*	Positive	Negative		Spec: 98.4%
GenoLyse®	GenoType MTBDRplus VER 2.0	Positive	39	0	PPV: 100%	Positive	49	1	PPV: 98.0%
		Negative	0	1	NPV: /*	Negative	12	60	NPV: 83.3%
		Culture/GT Myco CM and clinic			Sens: 97.5%	Culture/GT Myco CM and clinic			Sens: 78.3%
		Positive	Negative		Spec: /*	Positive	Negative		Spec: 96.0%
GXT	GenoType MTBDRplus VER 2.0	Positive	39	1	PPV: 97.5%	Positive	47	3	PPV: 94.0%
		Negative	1	0	NPV: /*	Negative	13	72	NPV: 84.7%

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value

* no value due to low sample number

For evaluation of resistance detection, the 156 samples (78 **GenoLyse**® isolates and 78 **GXT** isolates) were used which were MTBC-positive in both culture and **GenoType MTBDRplus** VER 2.0.

Table 2: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 for detection of RMP resistance from pulmonary clinical specimens compared to culture/DST

		Smear-positive			Sens: 100%	Smear-negative			Sens: 96.0%			
		Culture/DST		RMP-R		RMP-S	Culture/DST			RMP-R	RMP-S	Spec: 93.3%
GenoLyse®	GenoType MTBDRplus VER 2.0	RMP-R	25	1	Spec: 92.3%	RMP-R	24	1	Spec: 96.0%			
		RMP-S	0	12	NPV: 100%	RMP-S	1	14	NPV: 93.3%			
		Culture/DST			Sens: 96.3%	Culture/DST			Sens: 86.2%			
		RMP-R		RMP-S		RMP-R		RMP-S		Spec: 100%		
GXT	GenoType MTBDRplus VER 2.0	RMP-R	26	0	Spec: 100%	RMP-R	25	0	Spec: 100%			
		RMP-S	1	12	NPV: 92.3%	RMP-S	4	10	NPV: 71.4%			

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value;

RMP-R, resistant to rifampicin; RMP-S, sensitive to rifampicin

Table 3: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 for detection of INH resistance from pulmonary clinical specimens compared to culture/DST

GenoLyse®	GenoType MTBDRplus VER 2.0	Smear-positive			Sens: 96.7% Spec: 87.5% PPV: 96.7% NPV: 87.5%	Smear-negative			Sens: 96.7% Spec: 90.0% PPV: 96.6% NPV: 90.0%
		Culture/DST				Culture/DST			
		INH-R	INH-S			INH-R	INH-S		
		INH-R	29	1		INH-R	29	1	
		INH-S	1	7		INH-S	1	9	
GXT	GenoType MTBDRplus VER 2.0	Culture/DST			Sens: 100% Spec: 100% PPV: 100% NPV: 100%	Culture/DST			Sens: 90.6% Spec: 71.4% PPV: 93.5% NPV: 62.5%
		INH-R	INH-S			INH-R	INH-S		
		INH-R	28	0		INH-R	29	2	
		INH-S	0	11		INH-S	3	5	

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value;

INH-R, resistant to isoniazid; INH-S, sensitive to isoniazid

Cultured material

The diagnostic performance characteristics of the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 were determined in a study with 74 cultured samples compared to **GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0 and phenotypic drug susceptibility testing (DST). The study site was located in a low MDR-TB burden country. Manual DNA extraction was performed using the **GenoLyse**[®] kit according to the instructions for use. From 74 cultures, 49 were positive for *M. tuberculosis* complex (MTBC) and 25 cultures showed growth of nontuberculous mycobacteria. Hence, for resistance detection in cultured material, 49 isolates were available.

Table 4: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 for detection of MTBC from cultured material compared to culture/**GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0 [GT Myco CM]

		Culture/GT Myco CM		Sens: 100%
		Positive	Negative	Spec: 100%
GenoType MTBDRplus VER 2.0	Positive	49	0	PPV: 100%
	Negative	0	25	NPV: 100%

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value

Table 5: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 for detection of RMP resistance from cultured material compared to culture/DST

		Culture/DST		Sens: /*
		RMP-R	RMP-S	Spec: 100%
GenoType MTBDRplus VER 2.0	RMP-R	0	0	PPV: /*
	RMP-S	0	49	NPV: 100%

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value;
RMP-R, resistant to rifampicin; RMP-S, sensitive to rifampicin

* no value due to low sample number

Table 6: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 for detection of INH resistance from cultured material compared to culture/DST

GenoType MTBDRplus VER 2.0	Culture/DST		Sens: /*
	INH-R	INH-S	Spec: 100%
	INH-R	3	0
INH-S	0	46	NPV: 100%

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value;
INH-R, resistant to isoniazid; INH-S, sensitive to isoniazid

* no value due to low sample number

Analytical performance

Analytical specificity

The specificity of this test is ensured by the accurate design of specific primers and probes which considers, among others, homology comparisons of the sequences published in gene databases, and by stringent reaction conditions.

The analytical specificity was determined with 61 DNA isolates including the following MTBC strains: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti*, and *M. pinnipedii* [all RMP- and INH-sensitive]. The following strains not detectable with the test system were analyzed: *Actinomyces naeslundii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *C. bovis*, *C. durum*, *Escherichia coli*, *Gordona rubropertinctus*, *Klebsiella oxytoca*, *Mycobacterium abscessus*, *M. alvei*, *M. asiaticum*, *M. avium*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. chimaera*, *M. fortuitum* [2 sequevars], *M. frederiksbergense*, *M. gastri*, *M. genavense*, *M. goodii*, *M. gordonae*, *M. heckeshornense*, *M. immunogenum*, *M. interjectum*, *M. intermedium*, *M. intracellulare*, *M. lentiflavum*, *M. marinum*, *M. mucogenicum*, *M. palustre*, *M. peregrinum*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoidei*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. szulgai*, *M. triplex*, *M. ulcerans*, *M. xenopi*, MRSA, *Nocardia abscessus*, *N. africana*, *N. amarae*, *N. asteroides*, *N. farcinica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Rhodococcus erythropolis*, *Saccharomonospora glauca*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Tsukamurella inchenensis*, *T. pulmonis*.

The six MTBC isolates were correctly identified as RMP- and INH-sensitive MTBC strains. All other 55 isolates displayed no TUB band and no evaluable band pattern for RMP and INH resistances. Hence, an analytical specificity of 100% was achieved.

Analytical sensitivity (limit of detection, LOD)

For determination of analytical sensitivity of the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 for clinical samples, ten parallel BCG cultures were diluted and spiked into MTBC-negative sputum samples [final concentrations in sputum samples: 1000, 500, 160, and 100 CFU/ml]. Including a negative control, DNA was extracted once using the **GenoLyse**[®] kit and once using the **GXT DNA/RNA Extraction Kit**, and analyzed with the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 applying the "MDR DIR" PCR protocol. A limit of detection of 160 CFU/ml was determined with both extraction methods.

For determination of analytical sensitivity of the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 for culture samples, four BCG cultures (RMP- and INH-sensitive, 1.6×10^4 , 1.6×10^3 , 1.6×10^2 , and 100 CFU/ml) were set up in triplicate. Including a negative control, DNA was extracted using the **GenoLyse**[®] kit and analyzed with the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 applying the "MDR CUL" PCR protocol. A limit of detection of 1.6×10^4 CFU/ml was determined.

Reproducibility

In order to determine the intra-assay precision of the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0, two BCG cultures (RMP- and INH-sensitive, 1,500 and 150 CFU/ml) and an *M. avium* culture [10,000 CFU/ml] were set up in triplicate and spiked into negative sputum specimens. These samples and a negative control were tested with the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 under identical conditions, applying the "MDR DIR" PCR protocol. DNA extraction was performed once using the **GenoLyse**[®] DNA extraction kit, and once using the **GXT DNA/RNA Extraction Kit**. All parallels showed identical and correct banding patterns and comparable signal strengths. Additionally, signal strengths between the two DNA extraction methods and between different dilutions of the same samples were comparable. Hence, an intra-assay precision of 100% was achieved.

In order to determine the inter-assay precision of the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0, two BCG cultures (RMP- and INH-sensitive, 1,500 and 150 CFU/ml) and an *M. avium* culture (10,000 CFU/ml) were set up in triplicate and spiked into negative sputum specimens. These samples and a negative control were tested in nine runs: on three different days, using three different sets of instruments, and conducted by three different operators. DNA extraction was performed once using the **GenoLyse**® DNA extraction kit and once using the **GXT DNA/RNA Extraction Kit**. The "MDR DIR" PCR protocol was applied for PCR. Apart from the varied parameter, all other testing conditions were identical. No deviations were detected between parallel samples, that is between runs banding patterns were identical and correct and signal strengths were comparable. Moreover, signal strengths were comparable between different DNA extraction methods and different bacterial concentrations. Hence, the inter-assay precision was 100%.

Interfering substances

There are substances that may inhibit PCR reactions. Such inhibitors may, for example, originate from the culture medium. In order to assess if the medium influences the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0, 6 different *M. tuberculosis* complex samples (4 RMP- and INH-resistant, 2 RMP- and INH-sensitive) were cultured in 4 different media (solid media: Loewenstein-Jensen, Stonebrink, and Middlebrook-7H10, liquid medium: MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)). DNA was extracted from the culture samples using the **GenoLyse**® DNA extraction kit and then tested with the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0. All *M. tuberculosis* complex samples showed the same correct results. Hence, it can be excluded that the tested media import inhibitors into the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0.

Interfering substances may also be carried over from the sample material. Hence, the substances indicated in table 7 were tested in order to assess a potential interference of the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0. Defined BCG culture dilutions above and at the detection limit were spiked with various amounts of the potential inhibitors. From all samples, DNA extraction was performed using the **GenoLyse**® DNA extraction kit. Then the culture dilutions were tested with the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0.

Table 7: Tested potential interferents of the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0

Substance/class	Description/active ingredient	Test concentration(s)
Allergy relief medicines	Tea tree oil	0.008 % v/v to 0.5 % v/v
Anesthetics (endotracheal intubation)	Lidocaine HCl 4%	20% v/v; 30% v/v
Anesthetics (oral)	Benzocaine 20%	5% w/v
Antibiotics (nasal ointment)	Mupirocin	1.2 mg/ml; 2.4 mg/ml
Antibiotics (systemic)	Amoxicillin	2.2 µg/ml
Anti-tuberculosis drugs	Isoniazid 1 mg/ml	50 µg/ml
Anti-tuberculosis drugs	Rifampicin 1 mg/ml	25 µg/ml
Anti-tuberculosis drugs	Pyrazinamide 10 mg/ml	100 µg/ml
Anti-tuberculosis drugs	Ethambutol 1 mg/ml	5 µg/ml; 50 µg/ml
Anti-tuberculosis drugs	Streptomycin 1 mg/ml	25 µg/ml
Anti-viral drugs	Zanamivir	800 µg/ml
Blood	Whole blood	0.2% v/v to 5% v/v
Blood	Hemoglobin	0.05% v/v to 0.3% v/v
Bronchodilators	Theophylline	222 pmol/ml
DNA (human)		10 µg/ml
Expectorants (oral)	Guaifenesin 400 mg/pill	2.5 mg/ml; 5 mg/ml
Gastric acid	0.5% HCl, 0.1 M KCl, 0.1 M NaCl, pH 1-2	5% v/v
Influenza vaccine as nasal spray (FluMist®)	Live attenuated influenza vaccine	5% v/v
Inhaled bronchodilators	Salbutamol sulfate 2.5 mg/3 ml	50 µg/ml; 100 µg/ml
Mouthwash/gargle solutions	Listerine [eucalyptol 0.029%, menthol 0.042%, methyl-salicylate 0.06%, thymol 0.064%, denatured alcohol 20%]	20% v/v
Mucin: bovine submaxillary gland, type I-S	Purified mucin protein 5% w/v	1.5% w/v; 5% w/v
Nasal corticosteroids	Dexamethasone	1.52 pmol/ml
Nasal gel (homeopathic)	Sulfur	5% w/v
Nasal sprays or drops	Phenylephrine 0.5%	25% v/v; 100% v/v
Nebulizing solutions (hypertonic saline)	NaCl	3% w/v; 5% w/v
Physiologic saline	NaCl (0.9%)	0.9% w/v
<i>Pneumocystis jiroveci</i> medications	Pentamidine	300 ng/ml
Pus		0.2% v/v to 5% v/v
Specimen processing reagents	NALC-NaOH (N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide)	0.5% v/v; 1% v/v
Tobacco	Nicogel (40% tobacco extract)	0.5% w/v

Inhibition of the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 (invalid test result) was observed in the presence of the following substances in the concentrations as indicated: whole blood at 0.6%, hemoglobin at 0.1%, pus at 2%, lidocaine at 30%, mupirocin at 2.4 mg/ml, tea tree oil at 0.5%, and guaifenesin at 5 mg/ml.

Stability

Shelf life of the test kit when stored as recommended: see box label.

Stability is determined according to DIN EN ISO 23640.

References

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. WHO/CDS/TB/2018.20. World Health Organization, Geneva, Switzerland 2018.
2. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13: 1320–1330.
3. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th edition. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 2009.
4. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards), USA, Document M29 (please refer to the latest version).
5. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 1985.
6. Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA 1992.
7. Richter E, Beer J, Diel R, Hillemann D, Hoffmann H, Klotz M, Mauch H, Rüsche-Gerdes S. MiQ 5, Tuberkulose, Mykobakteriose. In: Podbielski A, Herrmann M, Kniehl E, Mauch H, Rüssmann H (eds): Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards. Elsevier, Munich, Germany 2010.
8. DIN, Deutsches Institut für Normung e.V. (ed). DIN 58943-4:2009-02: Medical microbiology - Diagnosis of tuberculosis - Part 4: Primary samples for the diagnosis of tuberculosis and mycobacteria – Qualitative and quantitative requirements, extraction, transport and storage. Beuth, Berlin, Germany 2009.
9. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993, 341: 647–650.
10. Alonso M, Palacios JJ, Herranz M, Penedo A, Menéndez A, Bouza E, García de Viedma D. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassignment of resistance category. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2688–2690.
11. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 496–514.
12. Crudu V, Stratan E, Romancenco E, Allerheiligen V, Hillemann A, Moraru N. First evaluation of an improved assay for molecular genetic detection of tuberculosis as well as RMP and INH resistances. *J Clin Microbiol* 2012; Epub ahead of print, doi:10.1128/JCM.05903-11.

Important Changes in IFU-304A-09

Chapter	Change
Reagents and Instruments, Ordering Information	Freezing and thawing kit constituents more than four times should be avoided. If necessary, aliquot reagents using suitable screw cap tubes.
Evaluation and Interpretation of Results	New: "In case of overall strong signal intensities but only weak staining or absence of the Amplification Control band, a single wild type band showing significantly weaker staining than the other wild type bands of the respective locus (or Locus Control band for <i>katG</i>) is to be considered negative."



Hain Lifescience GmbH

Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany

www.hain-lifescience.de, +49 (0) 74 73- 94 51- 0

GenoType MTBDR*plus*

VER 2.0

Руководство к пользованию

IFU-304A-09

CE

IVD

только для диагностики in vitro

2019-04-25



GenoType MTBDRplus VER 2.0

Молекулярно-генетическое исследование для идентификации комплекса *M. tuberculosis* и определения его устойчивости к Рифампицину и Изониазиду в клинических образцах и культивированных образцах

Пожалуйста, перед тем как начать работу с набором, внимательно изучите всю инструкцию по применению. Чтобы получить правильные результаты тестирования, строго придерживайтесь установленной процедуры.

Предназначение

Тест **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 - это качественный тест для диагностики *in vitro*, для идентификации комплекса *Mycobacterium tuberculosis* и определения его устойчивости к Рифампицину (RMP) и/или Изониазиду (INH) в положительных образцах мокроты или в отрицательных клинических и культивированных образцах. В туберкулёзный комплекс, входят следующие *M. tuberculosis*, вызывающие ТБ: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. canettii* и *M. pinnipedii*. Выявление устойчивости к рифампицину возможно при детекции наиболее значимых ассоциированных мутаций гена *rpoB*, (кодирующего бета субъединицу РНК полимеразы). Для выявления устойчивости к изониазиду, исследуют ген *katG*, (кодирующий каталазу пероксидазу) и область промотора в гене *inhA* (кодирующего NADH эноил АСР редуктазу).

Данный тест показан для диагностических целей и предназначен для использования в медицинских лабораториях.

Резюме и пояснения

Туберкулёз (ТБ) – это инфекционное заболевание бактериальной природы, передающееся, как капельная инфекция. В 2017 году в мире было зарегистрировано 10,0 млн. случаев ТБ, и около 1,3 млн. случаев со смертельным исходом [1]. Лечение ТБ требует длительной терапии на протяжении нескольких месяцев. Появление и распространение MDR-TB (множественной лекарственной устойчивости) стало основной медицинской и общественной проблемой, угрожающей здравоохранению в мировом масштабе. MDR-TB можно определить, как ТБ, устойчивый по крайней мере к рифампицину и изониазиду – двум наиболее важным противотуберкулёзным препаратам первого ряда [2]. Множественная лекарственная устойчивость является большой проблемой в борьбе с туберкулёзом из-за сложности диагностики и лечения. В 2013 году во всём мире было выявлено около 480 000 случаев мульти-резистентного туберкулёза из 11 миллионов случаев ТБ [1].

Если диагноз MDR-TB не подтверждён, применение неадекватного и, следовательно, неэффективного лечения антибиотиками, может привести к дальнейшему распространению устойчивых форм бактерии и к нарастанию устойчивости. Поэтому ускоренная диагностика и идентификация мульти-резистентного туберкулёза необходимое условие для подбора соответствующего лечения.

Принцип тестирования

Тест **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 основан на **DNA•STRIP** технологии. Процедура проведения теста подразделяется на три этапа: (i) выделение ДНК из клинических образцов (легочных, деконтаминированных) или культивированного материала (плотные/жидкие среды) - необходимые реагенты не поставляются, (ii) мультиплексная амплификация с биотинилированными праймерами, (iii) реверс-гибридизация.

Все реагенты, необходимые для амплификации, например, полимеразы или праймеры включены в Амплификационную Смесь А и В (АМ-А и АМ-В) и оптимизированы для данного теста. Мембраны стрипов покрыты специфическими зондами, комплементарными к амплифицированным нуклеиновым кислотам. После химической денатурации, одноцепочечные ампликоны связываются с зондами (гибридизация). Высоко специфичное связывание комплементарных цепей ДНК обусловлено жёсткими условиями, которые создаются в результате оптимального сочетания состава буфера и определённой температуры. Таким образом, зонды могут достоверно распознавать несколько вариантов последовательностей в тестируемой области гена. Конъюгированная стрептавидином щелочная фосфатаза связывается с биотином ампликонов посредством фрагментов стрептавидина. В итоге, щелочная фосфатаза превращает добавленный субстрат в окрашенную форму, которая становится видимой на мембране стрипов, как цветной преципитат. Простая и быстрая оценка полученных результатов проводится с помощью прилагаемого шаблона.

Реагенты и инструменты

Состав набора

Номер для заказа	304A	30496A
Количество тестов	12	96
Состав Комплекта 1 из 2 (хранить при температуре от 2°C до 8°C)		
Мембранные стрипы, покрытые специфическими пробами (MTBDRplus VER 2.0 STRIPS)	12	2x 48
Денатурирующий Раствор (DEN) содержит <2% NaOH, краситель	240 мкл	2x 960 мкл
Гибридизационный Буфер (HYB) содержит <10% анионное активное вещество, краситель	12 мл	96 мл
Раствор для Жесткой Промывки, (STR) содержит >25% четвертичных соединений аммиака, <1% анионных активных веществ, краситель	12 мл	96 мл
Раствор для Промывки, (RIN) содержит буфер, <1% NaCl, <1% неионогенное активное вещество,	36 мл	3x 96 мл
Концентрат Конъюгата (CON-C) содержит стрептавидин-конъюгированную щелочную фосфатазу, краситель	120 мкл	960 мкл
Буфер для Конъюгата (CON-D) содержит буфер, 1% блокирующего реагента, <1% NaCl	12 мл	96 мл
Субстратный Концентрат (SUB-C) содержит <70% диметилсульфоксида, <10% 4-нитро синего тетразолия хлорида, <10% 5-бромо-4-хлоро-3-индолил фосфата	120 мкл	960 мкл
Субстратный буфер (SUB-D) содержит буфер, <1% MgCl ₂ , <1% NaCl	12 мл	96 мл
Ванночка	1	4
Эталон для оценки	1	4
Руководство к пользованию	1	1
Шаблон	1	1
Этикетка партии	3	3
Состав Комплекта 2 из 2 (хранить при температуре от -20°C до -18°C)		
Амплификационная Смесь А (AM-A GT MTBDRplus VER 2.0) состоит из буфера, нуклеотидов, Таг полимеразы	120 мкл	4x 240 мкл
Амплификационная Смесь В (AM-B GT MTBDRplus VER 2.0) состоит из солей, специфических праймеров, красителя	420 мкл	4x 840 мкл

Хранение, обработка и утилизация компонентов набора

1/2 Состав Комплекта 1 из 2

2/2 Состав Комплекта 2 из 2

Хранить все Компоненты Комплекта 1 при температуре от 2°C до 8°C. Компоненты Комплекта 2 хранить при температуре от -20°C до -18°C и строго изолировано от контаминирующей ДНК. Не допускайте повторных циклов замораживания и оттаивания (>4x) AM-A и AM-B; при обработке небольшого количества образцов за одно тестирование, аликвотируйте AM-A и AM-B, используя подходящие пробирки с закручивающимися крышками (рекомендация: см. Главу Информации для заказа). После окончания срока годности, реактивы не использовать. Утилизация и уничтожение неиспользованных реагентов должны происходить в строгом соответствии с федеральными, государственными и местными законами.

Меры предосторожности при работе с компонентами набора

Необходимо соблюдать федеральные, государственные и местные законы безопасности труда и охраны окружающей среды. Всегда использовать защитную одежду и перчатки.

При работе с компонентами набора необходимо обращать внимание на следующие особые меры безопасности:

Буфер для Гибридизации (HYB) и Концентрат Субстрата (SUB-C) не классифицируются, как опасные вещества. Но, тем не менее, из-за некоторых ингредиентов, на них распространяется постановление об опасных веществах - EUN210: Паспорт безопасности доступен по запросу.



В Растворе для Денатурации (DEN) содержится <2% гидроксида натрия.

Осторожно!

H315: Вызывает раздражение кожи. H319: Вызывает серьезное раздражение глаз.

P280: Пользоваться защитными перчатками/защитной одеждой/ средствами защиты глаз. P305+351+338: ПРИ ПОПАДАНИИ В Г

ЛАЗА: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. P313: Обратиться к врачу.

Для получения дополнительной информации, пожалуйста, обратитесь к материалам по безопасности работы, которые можно загрузить с сайта: www.hain-lifescience.com/products/msds.html

Концентрат конъюгата (CON-C) и буфер для конъюгата (CON-D) содержат биологический материал. Соответственно, их следует рассматривать как потенциально опасные и обращаться с ними соответствующим образом (напр., см. [3] или [4]).

Необходимые, но не поставляемые материалы

- 0,5 мл пробирки с закрывающимися крышками или 1,5 мл пробирки с закрывающимися крышками для аликвот (Sarstedt, Nümbrecht, Германия, см. Информация для заказа)
- Фильтровальная бумага
- Микропипетки на 10, 20, 200 и 1000 мкл
- Одноразовые перчатки
- Одноразовые стерильные наконечники с фильтром
- Мерный цилиндр
- ПЦР-пробирки без ДНКаз и РНКаз
- Водяная баня с шейкером + Горизонтальная платформа **или** TwinCubator (аппарат для мануальной гибридизации) **или** аппарат для автоматизированной гибридизации
- Термоциклер
- Таймер
- Пинцет
- вода (дистиллированная)
- Вода (для молекулярно-биологических исследований, для отрицательного контроля)
- Наборы для выделения ДНК (**GenoLyse®** или **GXT DNA/RNA Extraction Kit**, см. главу Информация для заказа) а также необходимое оборудование
- Реагенты для деконтаминации образца, а так же необходимое оборудование
- Реагенты для культивирования микобактерий и необходимое для амплификации оборудование (если используются культивированные образцы)

Контроль качества

Чтобы убедиться в корректном проведении тестов и для контроля функционирования всех компонентов набора, на каждом стрипе есть 5 контрольных зон:

- Зона Контроля Конъюгата (CC) для проверки связывания конъюгата со стрипом и правильного выполнения хромогенной реакции
- Зона Контроля Амплификации (AC), которая указывает на успешное проведение амплификации
- Три зоны Контроля Локусов (*rpoB*, *katG* и *inhA*), для проверки оптимальной чувствительности реакции для каждого тестируемого локуса

При проведении амплификации необходимо соблюдать обычные меры безопасности. Особенно важно, чтобы все реагенты и материалы, используемые для выделения ДНК и проведения амплификации, не содержали ДНК-аз.

Не комбинируйте и не пулируйте Амплификационные миксы или мембранные стрипы из разных наборов, если их лоты не совпадают. Номер партии набора и соответствующие номера партий компонентов набора находятся на этикетках партии, вложенных в комплект.

Проба отрицательного контроля для выявления возможной контаминации, содержащая воду вместо ДНК, должна быть включена при каждом тестировании (вода должна быть пригодна для молекулярно-биологических исследований). Соответствующие тест-стрипы должны показать только полоски CC и AC.

Требования к образцу

В качестве исходного материала для выделения ДНК можно использовать деконтаминированные образцы от пациентов с положительными и отрицательными результатами микроскопии, это может быть мокрота (отделяемое или мокрота), бронхиальный материал (например, бронхоальвеолярные смывы), или аспираты (например, плевральный аспират), а так же культивированные образцы (плотные/жидкие среды). Перед окончательной редакцией данной инструкции, основные характеристики теста не были валидированы на других образцах, не отмеченных выше.

Меры предосторожности при работе с образцами

Образцы от пациентов и культуры, полученные из образцов пациентов, всегда должны рассматриваться, как инфекционные, и работать с ними следует соответственным образом (см. [3] или [4]). Всегда использовать защитную одежду и перчатки. Образцы от пациентов из группы риска (инфицированные патогенными микроорганизмами и вирусами, включая гепатит Б и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)) и культуры, полученные из этих образцов, всегда должны быть промаркированы, и работать с ними необходимо, соблюдая все меры предосторожности, согласно принятым в данном институте правилам.

Со всеми образцами, которые могут содержать микобактерии, следует обращаться, применяя методики Biosafety Level 2 или, когда это указано, методики Biosafety Level 3 (например, см. [3]). Необходимо соблюдать федеральные, государственные и местные законы безопасности труда и охраны окружающей среды.

Сразу же после использования, выбросьте отработанные наконечники пипеток в контейнер для биологически опасных отходов. По окончании исследования, выбросьте все отработанные материалы в контейнер для биологически опасных отходов.

Хранение и транспортировка

Все образцы должны быть собраны и транспортированы согласно рекомендациям публикации CDC «Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory» [5], «Clinical Microbiology Procedures Handbook» [6], или согласно требованиям лабораторной процедуры.

Необходимо строго соблюдать условие, что до проведения деконтаминации, образцы должны храниться в стерильном пластиковом контейнере при температуре от 2°C до 8°C. Транспортировка образцов при комнатной температуре должна быть выполнена в максимально короткие сроки – в течение 1-2 дней [7,8]. Образцы, используемые для деконтаминации, должны быть со сроком не более 4-х дней.

После деконтаминации и последующего ресуспендирования бактериального осадка фосфатным буфером, образцы можно хранить при –20°C или –80°C максимум – 5 дней до проведения выделения ДНК.

Подготовка

Клинические образцы должны быть обработаны NALC-NaOH по методу, описанному в публикации CDC «Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory» [5]. После деконтаминации, клеточный осадок следует ресуспендировать не более, чем в 1-1,5 мл фосфатного буфера. При тестировании образцов пациентов, избыточный объем может понизить чувствительность теста. По причине неоднородности материала, деконтаминированный образец необходимо перемешать перед тем, как взять аликвоту; иначе, чувствительность теста может снизиться.

Если образец надо культивировать, культивирование можно проводить как на плотной среде (например, Loewenstein-Jensen, Middlebrook), так и в жидкой среде (например, MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)).

Обработку потенциально инфекционных образцов надо проводить в вытяжном шкафу II класса безопасности.

Выделение ДНК

Исходным материалом для выделения ДНК могут быть использованы деконтаминированные образцы пациентов, а так же бактериальный рост с плотной среды (например, Loewenstein-Jensen, Middlebrook) или жидкой среды (например, MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)).

Для выделения ДНК из деконтаминированных NALC-NaOH клинических образцов или культивированного материала, набор **GenoLyse® kit** (см. главу Информация для заказа). Как альтернатива, для автоматизированного выделения ДНК, можно комбинировать **GenoXtract®** и набор для выделения **GXT DNA/RNA Extraction Kit** (см. главу Информация для заказа). Чтобы получить рекомендации по работе, обратитесь к соответствующей инструкции по применению.

Упомянутые здесь методы были использованы для оценки теста **GenoType MTBDRplus** VER 2.0. Перед окончательной редакцией данной инструкции, основные характеристики теста не были валидированы на других методах выделения ДНК.

Амплификация

Все реагенты, необходимые для амплификации, например, полимеразы или праймеры включены в Амплификационную Смесь А и В (АМ-А и АМ-В) и оптимизированы для данного теста. Перед приготовлением основной смеси быстро разморозьте АМ-А и АМ-В, быстро осадите путем центрифугирования и осторожно перемешайте пипетированием. Пипетируйте АМ-А и АМ-В только в комнате, чистой от контаминирующей ДНК. Во избежание контаминации растворы ДНК следует вносить в отдельном рабочем помещении.

Подготовьте для каждого образца:

После выделения ДНК набором **GenoLyse®**

- 10 мкл АМ-А (см. Состав Комплекта 2)
- 35 мкл АМ-В (см. Состав Комплекта 2)
- 5 мкл раствора ДНК
- Конечный объем: 50 мкл

После выделения ДНК набором **GXT DNA/RNA Extraction Kit**

- 10 мкл АМ-А (см. Состав Комплекта 2)
- 35 мкл АМ-В (см. Состав Комплекта 2)
- 10 мкл раствора ДНК
- Конечный объем: 55 мкл

Определите общее количество образцов (количество анализируемых проб + контрольные образцы). Подготовьте необходимое количество пробирок. Подготовьте мастер-микс, содержащий АМ-А и АМ-В и аккуратно, но тщательно перемешайте (не на вортексе).

Как альтернатива, содержащее реакционной пробирки АМ-А можно полностью перенести в реакционную пробирку АМ-В. Это доводит мастермикс до для 12 реакций амплификации (набор на 12 тестов) или, соответственно, для 4х 24 реакций амплификации (набор на 96 тестов). Пожалуйста, обратите внимание на то, что мастер микс должен быть свежее- приготовленным каждый раз и его следует сразу использовать. Аликвотируйте по 45 мкл в каждую подготовленную ПЦР-пробирку и добавьте в одну аликвоту 5 или 10 мкл воды (вода должна быть пригодна для молекулярно-биологических исследований; отрицательный контрольный образец). В отдельном помещении добавьте 5 или 10 мкл раствора ДНК в каждую аликвоту (исключение – отрицательный контроль).

Программа амплификации:

При использовании термоциклера от Hain Lifescience с соответствующими предустановками, выберите протокол «MDR DIR» для клинических образцов и протокол «MDR CUL» для культивированных образцов.

	клинические образцы	культивированные образцы
15 мин 95°C	1 цикл	1 цикл
30 сек 95°C 2 мин 65°C	20 циклов	10 циклов
25 сек 95°C 40 сек 50°C 40 сек 70°C	30 циклов	20 циклов
8 мин 70°C	1 цикл	1 цикл
Нагрев	≤2,2°C/сек	≤2,2°C/сек

Нагревательная крышка термоциклера должна быть включена в течение всей программы.

Продукты амплификации могут храниться при температуре от –20°C до 8°C.

Гибридизация

При использовании аппарата для гибридизации от Hain Lifescience, пожалуйста, внимательно изучите документ «Overview equipment programs» доступный на сайте www.hain-lifescience.com, для того, чтобы определить наиболее подходящий для использования протокол гибридизации.

Следующий протокол описывает мануальную гибридизацию с использованием водяной бани или **TwinCubator**.

Подготовка

Предварительно прогреть водяную баню с шейкером до 45°C (максимально допустимое отклонение температуры ±1°C) или включить **TwinCubator**. Растворы НУВ и STR перед применением нужно предварительно прогреть до 37-45°C. В реагентах не должно быть осадка (при этом обратите внимание, что раствор CON-D опалесцирует). При необходимости перемешать растворы. За исключением CON-C и SUB-C, довести остальные растворы до комнатной температуры. В подходящей пробирке разведите Концентрат Конъюгата (CON-C – оранжевый) и Концентрат Субстрата (SUB-C – желтый) в соотношении 1:100 в соответствующем буфере (CON-C с CON-D, SUB-C с SUB-D) в необходимом количестве. Хорошо перемешайте и доведите до комнатной температуры. Из расчета на каждый стрип: добавьте 10 мкл концентрата к 1 мл соответствующего буфера. CON-C разводится перед каждым использованием. Разведенный SUB-C можно хранить 4 недели в защищенном от света месте при комнатной температуре.

- Внесите по 20 мкл Денатурирующего Раствора (DEN, голубого цвета) в угол каждой ячейки.
- Добавьте в раствор по 20 мкл продукта амплификации, перемешайте пипетированием и инкубируйте 5 мин при комнатной температуре.
В это время пинцетом выньте стрипы из тубы и подпишите их карандашом под цветной полосой. При работе со стрипами всегда используйте перчатки!
- Осторожно добавьте в каждую ячейку по 1 мл предварительно нагретого Гибридизационного Буфера (НУВ, зеленого цвета). Аккуратно покачивайте ванночку до получения однородного окрашивания.
Следите, чтобы раствор не попал в соседние ячейки.
- Поместите стрипы в ячейки.
Стрипы должны быть полностью погружены в раствор, лицевой стороной (определяемой по цветной полосе на нижнем конце) вверх. Если стрип перевернулся, его нужно поправить пинцетом. Во избежание контаминации тщательно мойте пинцет после каждого применения. Это важно и на всех последующих этапах теста.
- Поместите ванночку на водяную баню с шейкером/TwinCubator и инкубируйте 30 мин при температуре 45°C.
Установите скорость встряхивания водяной бани так, чтобы жидкость постоянно перемешивалась, но не попадала в соседние ячейки. Чтобы установить равномерное распределение температуры, ванночку погружают в воду на 1/3 высоты.
- Полностью аспирируйте Гибридизационный Буфер.
К примеру, можно использовать пастеровскую пипетку, соединенную с вакуумным насосом.
- Добавьте по 1 мл Раствора для Жесткой Промывки (STR, красного цвета) в каждый стрип и инкубируйте 15 мин при 45°C в водяной бане с шейкером/TwinCubator.
- Далее работайте при комнатной температуре.
Полностью удалите раствор для Жесткой Промывки.
Слейте мойущий раствор в контейнер для отходов, а остатки жидкости удалите похлопыванием ванночки по фильтровальной бумаге. Таким же образом поступайте и при следующих этапах отмывки.
- Отмойте каждый стрип в 1 мл Промывающего Раствора (RIN) в течение 1 мин на платформе шейкера/ TwinCubator (слейте RIN после инкубации).
- Добавьте по 1 мл разведенного Конъюгата (см. выше) в каждый стрип и инкубируйте 30 мин на платформе шейкера/ TwinCubator.

11. Удалите раствор и промойте каждый стрип дважды по 1 мин в 1 мл Промывающего Раствора (RIN) и один раз 1 мин примерно в 1 мл дистиллированной воды (используйте флакон для промывки) на платформе шейкера/ TwinCubator (Сливая раствор каждый раз). После последней промывки тщательно удалите все остатки воды.
12. Добавьте по 1 мл разведенного субстрата (см. выше) в каждый стрип и инкубируйте без встряхивания, защищая от света. В зависимости от условий теста (например, температуры в комнате), время инкубации субстрата, а именно время, пока полоски не станут четко видимыми, может варьировать от 3 до 20 мин. Слишком длительная инкубация может привести к избыточному развитию фоновой окраски, и, тем самым может способствовать неправильной интерпретации результатов.
13. Как только полоски станут четко видимыми, остановите реакцию быстрым двукратным промыванием дистиллированной водой.
14. Пинцетом удалите стрипы из ванночки и высушите их между двумя слоями фильтровальной бумаги.

Оценка и интерпретация результатов

Подклейте стрипы и храните в защищенном от света месте. Эталон для оценки поставляется в наборе. При использовании этого эталона оценки, наклейте окрашенные стрипы в предназначенные для этого поля, причем полоски СС и АС должны совпадать с соответствующими линиями на эталоне. По техническим причинам расстояние между отдельными пробами может немного отличаться. **Поэтому для точной оценки результатов необходимо применять специально поставляемый шаблон, приведя в соответствие его полосы так, чтобы они совпадали с отдельными полосами каждого локуса, соответствуя линии Локус Контроля.** Определите степень устойчивости и сделайте пометку в соответствующей колонке. Некоторые примеры интерпретации полученных результатов приведены в следующей главе. На каждом стрипе всего 27 зоны реакции (см. рис.).

.....	Контроль конъюгата [CC]
.....	Зона Контроля Амплификации [AC]
.....	Комплекс <i>M. tuberculosis</i> [TUB]
.....	<i>groB</i> Контроль Локуса [<i>groB</i>]
.....	<i>groB</i> проба дикого типа 1 [<i>groB</i> WT1]
.....	<i>groB</i> проба дикого типа 2 [<i>groB</i> WT2]
.....	<i>groB</i> проба дикого типа 3 [<i>groB</i> WT3]
.....	<i>groB</i> проба дикого типа 4 [<i>groB</i> WT4]
.....	<i>groB</i> проба дикого типа 5 [<i>groB</i> WT5]
.....	<i>groB</i> проба дикого типа 6 [<i>groB</i> WT6]
.....	<i>groB</i> проба дикого типа 7 [<i>groB</i> WT7]
.....	<i>groB</i> проба дикого типа 8 [<i>groB</i> WT8]
.....	<i>groB</i> мутантная проба 1 [<i>groB</i> MUT1]
.....	<i>groB</i> мутантная проба 2A [<i>groB</i> MUT2A]
.....	<i>groB</i> мутантная проба 2B [<i>groB</i> MUT2B]
.....	<i>groB</i> мутантная проба 3 [<i>groB</i> MUT3]
.....	<i>katG</i> Контроль Локуса [<i>katG</i>]
.....	<i>katG</i> проба дикого типа [<i>katG</i> WT]
.....	<i>katG</i> мутантная проба 1 [<i>katG</i> MUT1]
.....	<i>katG</i> мутантная проба 2 [<i>katG</i> MUT2]
.....	<i>inhA</i> Контроль Локуса [<i>inhA</i>]
.....	<i>inhA</i> проба дикого типа 1 [<i>inhA</i> WT1]
.....	<i>inhA</i> проба дикого типа 2 [<i>inhA</i> WT2]
.....	<i>inhA</i> мутантная проба 1 [<i>inhA</i> MUT1]
.....	<i>inhA</i> мутантная проба 2 [<i>inhA</i> MUT2]
.....	<i>inhA</i> мутантная проба 3A [<i>inhA</i> MUT3A]
.....	<i>inhA</i> мутантная проба 3B [<i>inhA</i> MUT3B]
.....	цветовая маркировка

Обратите внимание: Стрип изображен не в натуральную величину.

Контроль Конъюгата (CC)

В этой зоне должна быть хорошо проявлена линия, подтверждающая эффективность связывания конъюгата и правильность субстратной реакции.

Зона Контроля Амплификации (AC)

Если тест выполнен правильно, контроль ампликонов, свяжется с Зоной Контроля Амплификации на стрипе. Только полоски с интенсивностью сигнала такой же или более интенсивной, чем в зоне Контроля Амплификации (AC), могут приниматься во внимание.

В случае положительного результата тестирования, сигнал в зоне Контроля Амплификации может быть слабым или совсем невидимым. Это может быть вызвано конкурентными реакциями во время амплификации. В этом случае, тестирование считается выполненным правильно и не требует повторения.

Если развились только полоски СС и АС, это значит, что отрицательный результат верен. Отсутствие полоски АС в случае отрицательного результата, указывает на ошибку во время проведения амплификации в процессе настройки и/или при выполнении реакции амплификации, или на присутствие ингибиторов амплификации. В этом случае результаты тестирования недействительны и необходимо повторное тестирование соответствующего образца. В случае наличия общей сильной интенсивности сигнала, но при наличии только слабого окрашивания или при отсутствии полосы Контроля Амплификации, нельзя оценить одну полосу дикого типа, демонстрирующую значительно более слабое окрашивание, чем другие полосы дикого типа соответствующего локуса (или полосы Контроля Локуса для *katG*).

Комплекс *M. tuberculosis* (TUB)

Эта зона гибридизируется с ампликонами, полученными от всех представителей комплекса *M. tuberculosis*. Если зона TUB отрицательная и, в то же время, полоска оценки устойчивости не развивается так, чтобы её можно было учесть, это означает, что в тестируемом образце не содержатся бактерии, относящиеся к комплексу *M. tuberculosis* и образец не может быть проверен данной тест- системой. В редких случаях зона TUB может быть отрицательной с одновременным развитием полоски устойчивости, которую можно учитывать. В таком случае, можно заподозрить присутствие штамма, принадлежащего к комплексу *M. tuberculosis*, и должно быть выполнено повторное тестирование (см. ниже «особые случаи», п.3.).

Контроли локусов (*groB*, *katG* и *inhA*)

Зоны Контроля Локусов улавливают специфичные для каждого локуса участки генов. В случае положительного результата тестирования, (видимая полоска в диапазоне дикого типа и мутантного образца) сигнал в зоне Локус Контроля может быть слабым.

Пробы дикого типа

Пробы дикого типа охватывают важнейшие участки устойчивости каждого гена (см. рис. 1, а так же таб. 1, 2 и 3). Если все пробы дикого типа одного гена показывают положительный сигнал, значит в нуклеотидной последовательности не зафиксировано ни одной мутации. Это свидетельствует о том, что тестируемый штамм чувствителен к соответствующим антибиотикам.

В случае мутации, определённые ампликоны не могут связаться с соответствующими пробами диких типов. Отсутствие сигнала хотя бы в одной пробе дикого типа указывает на устойчивость тестируемого штамма к соответствующим антибиотикам.

Каждый образец полоски, отличный от образца полоски дикого типа указывает на устойчивость тестируемого штамма. Полоска, проявившаяся в зоне гена *groB* говорит об устойчивости тестируемого штамма к рифампицину, полоска в зоне гена *katG* и *inhA* позволяет сделать выводы об устойчивости тестируемого штамма к изониазиду.

Мутантные пробы

Мутантные пробы выявляют наиболее часто встречаемые мутации, вызывающие устойчивость. (см. Таб. 1, 2 и 3). В сравнении с другими пробами, положительные сигналы в мутантных пробах *groB* MUT2A и MUT2B могут проявлять сигнал меньшей интенсивности. В редких случаях, когда полоска *groB* MUT3 положительная, слабое окрашивание наблюдаемое в полоске *groB* WT8, считается отрицательным. Каждая полоска, отличающаяся от полосок дикого типа, указывает на устойчивость тестируемого штамма. Образцовая полоска, появившаяся в пробе *groB*, позволяет сделать вывод об устойчивости исследуемого штамма к рифампицину, появление полоски *katG* – и *inhA* – об устойчивости к изониазиду.

Пожалуйста, обратите внимание:

Только полоски с интенсивностью сигнала такой же или более интенсивной, чем в зоне Контроля Амплификации (AC), могут приниматься во внимание. Не все полоски на стрипе могут показывать одинаковую силу сигнала.

Обратите внимание на следующие особые случаи :

1. Существует вероятность того, что в исследуемом образце содержатся гетерорезистентные штаммы. При гетерорезистентности, в соответствующих образцах можно определить последовательности как мутантных, так и диких типов; следовательно, на стрипах может проявиться как одна из мутантных проб, так и соответствующая проба дикого типа. Будет ли соответствующая резистентность фенотипически обусловленной, зависит от соотношения мутантных и не-мутантных последовательностей в данном исследовании.
2. Возможны ситуации, когда, исследуемый образец одновременно содержит несколько штаммов комплекса *M. tuberculosis* (смешанная культура или контаминация). Если хотя бы один из штаммов имеет мутацию, то положительно окраситься может полоска, как в мутантной пробе, так и в соответствующей пробе дикого типа. Будет ли соответствующая резистентность фенотипически обусловленной, в данном исследовании зависит от соотношения устойчивых и чувствительных штаммов
3. Существует вероятность того, что по причине микс-инфекции в тестируемом образце содержится как комплекс *M. tuberculosis*, так и не туберкулёзные микобактерии. В редких случаях полоска TUB может отсутствовать из-за конкуренции единичных реакций амплификации в процессе ПЦР. Однако, если развивается полоска устойчивости, которую можно учесть, возникает подозрение на присутствие штаммов, относящихся к *M. tuberculosis* комплексу и требуется повторное тестирование.
4. В редких случаях все полоски локуса гена (включая и полоску Локус Контроля), могут полностью отсутствовать на тестовом стрипе. Если такой результат получился в клиническом образце, возможной причиной, (но не единственной) может быть то, что концентрация ДНК в образце ниже предела детекции или в образце присутствуют интерферирующие вещества. Такого вида полоску нельзя оценивать и тестирование необходимо повторить.
Если в культивированных образцах получились результаты с полным отсутствием локуса *katG*, это указывает на INH резистентность исследуемого штамма.

Регионы устойчивости и мутации, опосредствующие общую устойчивость

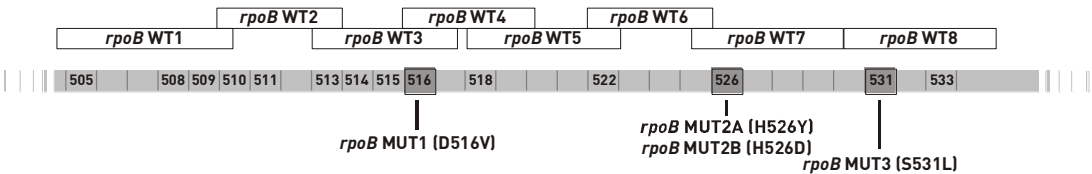


Рис 1: Области устойчивости к рифампицину гена *groB*

groB WT1-8: *groB* - зоны дикого типа; *groB* MUT1-3: *groB*-зоны мутаций. Числа указывают положения аминокислот (кодонов) для всех мутаций, перечисленных в таблице. Кодоны, для которых разработаны мутантные пробы, выделены.

Таблица 1: Мутации в гене *groB* и соответствующие дикие типы и мутантные полоски (согласно [9]).

слабые полоски дикого типа	исследованные кодоны	развивающаяся мутантная полоска	мутация
<i>groB</i> WT1	505-509		F505L T508A S509T
<i>groB</i> WT2	510-513		Q510H L511P*
<i>groB</i> WT2/WT3	510-517		Q513L* Q513P del514-516
<i>groB</i> WT3/WT4	513-519	<i>groB</i> MUT1	D516V D516Y del515
<i>groB</i> WT4/WT5	516-522		del518* N518I
<i>groB</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>groB</i> WT7	526-529	<i>groB</i> MUT2A <i>groB</i> MUT2B	H526Y H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C
<i>groB</i> WT8	530-533	<i>groB</i> MUT3	S531L S531Q* S531W L533P

* Эти редкие мутации были выявлены пока только теоретически (in silico).

Таблица 2: Мутации в гене *katG* и соответствующие дикие типы и мутантные полоски.

слабые полоски дикого типа	исследованные кодоны	развивающаяся мутантная полоска	мутация
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1	S315T1
		<i>katG</i> MUT2	S315T2

Таблица 3: Мутации в области промотора *inhA* и соответствующие дикие типы и мутантные полоски.

слабые полоски дикого типа	исследованные положения аминокислот	развивающаяся мутантная полоска	мутация
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C-15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A-16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T-8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T-8A

Примеры интерпретации результатов

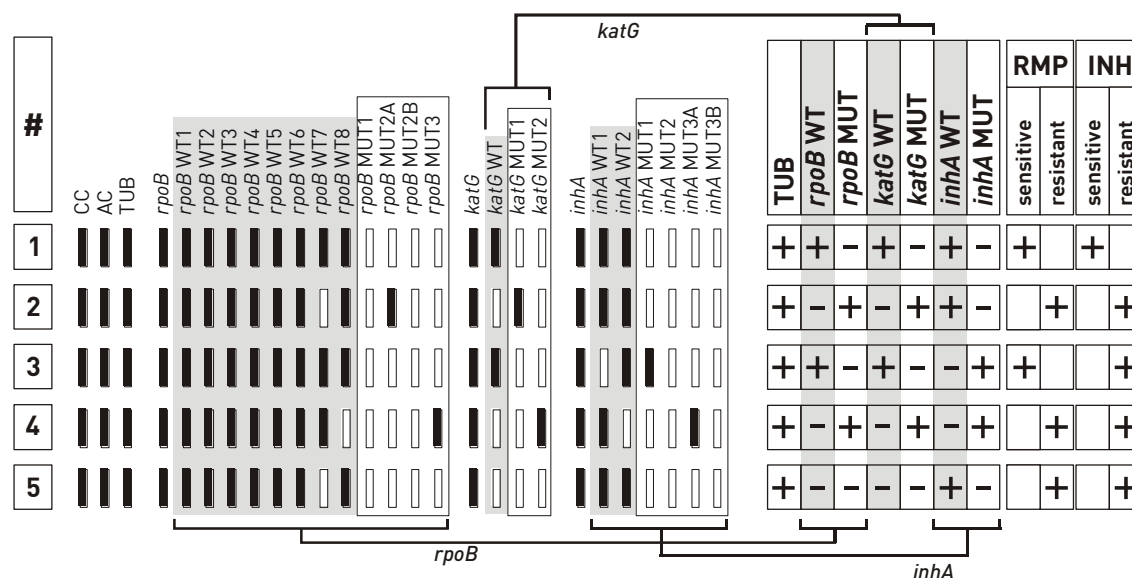


Рис. 2: Примеры образцовых полосок и их интерпретации относительно устойчивости к рифампицину и/или изониазиду.

Если все полоски дикого типа показывают окрашивание, то это оценивается как положительный результат, и отмечается в колонке WT (ДТ) соответствующего гена, как «+». Если отсутствует хотя бы одна из полосок дикого типа, то это оценивается как отрицательный результат и отмечается в колонке WT (ДТ) этого гена, как «-». Отрицательную пометку можно поставить в колонке мутаций, только если ни одна из мутантных полосок не проявилась. Если хотя бы одна из мутантных полосок окрасилась, то результат расценивается как положительный и колонка MUT соответственного гена обозначается, как «+».

Далее – пояснения к двум, вышеуказанным примерам:

В примере 1 показаны полоски дикого типа. Сигнал есть во всех пробах дикого типа, но отсутствует в мутантных пробах. Поэтому на оценочной карте стоит «+» в трёх колонках дикого типа и «-» в трёх колонках мутантного типа. Соответственно, ячейки «RMP sensitive» и «INH sensitive» помечаются, как «+».

В примере 5 одна из проб дикого типа *rpoB* и *katG* отсутствует, поэтому ячейки *rpoB* WT и *katG* WT помечаются «-». Поскольку нет развития окрашивания ни в одной из мутантных проб, то эти ячейки тоже помечаются, как «-». Область промотора *inhA* не отличается от образцов дикого типа. Штамм оценивается, как RMP- и INH устойчивый.

Ограничения метода

Чтобы получить правильные результаты и избежать контаминации, строго придерживайтесь установленного протокола и процедуры тестирования.

Этот тест может проводиться только обученным высококвалифицированным персоналом, который знаком с молекулярно-биологическими методами.

Данный тест отражает знания, накопленные на сегодняшний день компанией Hain Lifescience.

Как и любая методика, основанная на ДНК, данный тест лишь обеспечивает скрининг последовательностей нуклеиновых кислот, а не аминокислот. В связи с этим возможно, что мутации в области пробы, не приводящие к замене аминокислот (молчащие мутации), тем не менее, ведут к отсутствию одной из полосок дикого типа. В редких случаях была замечена молчащая мутация в кодоне 514 гена *rpoB*, ведущая к отсутствию полоски *rpoB* WT3 [10]. Таким образом, если выявленная устойчивость обусловлена исключительно пропущенной *rpoB* WT3, то следует принимать во внимание результаты фенотипической устойчивости.

Появились публикации о дополнительных мутациях в пределах области тестируемого гена *rpoB* [11], приводящих к устойчивости к рифампицину. Поскольку эти мутации очень редки, то невозможно было их подтвердить на данной тест-системе, они были установлены только *in silico*.

Тест **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 определяет устойчивость комплекса *M. tuberculosis* только в тех случаях, когда её происхождение связано с наличием мутаций в участках генах *rpoB*, *katG* и *inhA*. Резистентность, вызванная мутациями других генов или областями генов, так же как и другие механизмы устойчивости к рифампицину и изониазиду, в данной тест-системе не выявляются.

Теоретически, устойчивость может иметь место, не смотря на дикий тип. Если исследуемый образец содержит штамм, проявляющий гетерорезистентность и резистентность, обусловлена мутацией, не включённой в мутантные пробы, то проявится полоска в диких типах. Аналогично, если в образце содержится более чем один штамм *M. tuberculosis*, (по причине смешанной культуры или контаминации) и один из них не включён в мутантные пробы, также проявится полоска в диких типах.

Как и любой метод выявления ДНК, рутинные тест-системы улавливают ДНК из жизнеспособных и нежизнеспособных бактерий. Таким образом, **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 тест, не может быть использован для мониторинга прогрессирования или успешности лечения пациентов, находящихся на антимикробной терапии.

GenoType MTBDRplus VER 2.0 выдаёт качественные результаты. Интенсивность полосок на стрипах не даёт информации о количестве клеток в положительных образцах.

Присутствие нескольких видов бактерий в анализируемом образце может помешать правильной интерпретации теста.

Микроорганизмы, относящиеся к комплексу MTB, не могут быть дифференцированы.

Данный тест работает только в пределах участка генома, из которого были выбраны праймеры и зонды.

Как и в любой системе детекции на основе гибридизации, в данной тест-системе допускается возможность того, что вариации последовательности в участке генома, для которого выбраны праймеры и пробы, но для детекции которых тест-система не предназначена, могут привести к ложным результатам. По причине высокой вариабельности бактериального генома, возможно, что определенные подтипы не будут распознаны.

Оценка технических характеристик для данного исследования была выполнена с использованием набора **GenoLyse®** для выделения ДНК из деконтаминированной положительной мокроты и отрицательных образцов пациентов, а так же культивированных образцов с использованием набора **GXT DNA/RNA Extraction Kit** для автоматического выделения ДНК из деконтаминированных клинических образцов. До появления данной редакции рабочей инструкции, технические характеристики теста не были валидированы для других методов выделения ДНК или материалов образцов.

Результаты тестирования должны интерпретироваться совместно с результатами других лабораторных исследований и клинических данных, доступных для лечащего врача. К тому же, в некоторых случаях следует принимать во внимание результаты определения фенотипической резистентности.

Пользователи данной тест-системы должны иметь информацию о распределении локальных мутаций генов, выявляемых данным тестом или запросить её. Может понадобиться подтверждение результатов теста путём выявления фенотипической резистентности.

Решение проблем

Сплошные слабые сигналы или отсутствие сигналов (включая зону Контроля Конъюгата)

- Комнатная температура слишком низкая или реактивы не доведены до комнатной температуры.
- Отсутствует или в недостаточном количестве внесён CON-C и/или SUB-C.

Повторите этап реверс-гибридизации.

Слабые сигналы или их отсутствие за исключением зоны Контроля Конъюгата

- Качество выделенной ДНК оказалось несоответствующим для проведения реакции амплификации. Повторите выделение.
- Амплификационные Смеси (AM-A и AM-B) недостаточно хорошо перемешаны или добавлены в ошибочном количестве. Подготовьте новый мастер микс и повторите амплификацию.
- Температура инкубации слишком высокая. Повторите этап реверс-гибридизации.

Негомогенное окрашивание

- Во время инкубации, стрипы не были полностью погружены в раствор.
- Ванночка недостаточно встряхивалась.

Повторите этап реверс-гибридизации.

Сильное фоновое окрашивание

- Использовались слишком концентрированные растворы CON-C и/или SUB-C
- Этапы промывки не были выполнены соответствующим образом
- Отмывающие растворы слишком холодные

Повторите этап реверс-гибридизации.

Неожиданный результат

- Неверная температура инкубации.
- Гибридизационный Буфер и/или Раствор для Жесткой Промывки недостаточно нагреты или перемешаны.
- Контаминация между соседними ячейками во время добавления Гибридизационного Буфера.
- **Повторите этап реверс-гибридизации.**
- Контаминация выделенной ДНК фрагментами ДНК, выделенной или амплифицированной ранее. Повторите выделение.
- Контаминация реагентов для амплификации. В этом случае, отрицательный контроль образца проявится в виде дополнительной полоски возле CC и AC. Повторите амплификацию с новыми реагентами.
- В зависимости от количества введенной амплифицированной ДНК и специальных условий реакции, может происходить интенсивное окрашивание и быстрое развитие цветной реакции. В таких случаях, остановите инкубацию, как только полосы станут видимы, чтобы предотвратить развитие перекрёстно-гибридизированных полос.
- Исходный материал не является чистой культурой. Повторите культивирование, чтобы исключить контаминацию.
- Неправильное взятие образца, его хранение и транспортировка, или неправильная подготовка образца. Запросите новый образец и повторите тестирование.
- Ошибка на этапе выделения ДНК. Повторите выделение.

Информация для заказа

Hain Lifescience	Номер для заказа
GenoType MTBDRplus VER 2.0 (набор для анализа 12 образцов)	304A
GenoType MTBDRplus VER 2.0 (набор для анализа 96 образцов)	30496A
GenoLyse ® (набор для ручного выделения ДНК, рассчитанный на 12 образцов)	51612
GenoLyse ® (набор для ручного выделения ДНК, рассчитанный на 96 образцов)	51610
GXT DNA/RNA Extraction Kit (набор для автоматизированного выделения ДНК/РНК с использованием GenoXtract ®, рассчитан на 96 образцов)	12.01.02
GenoXtract ® (Аппарат для выделения нуклеиновых кислот, обрабатывающий до 12 образцов)	8.31.01
Sarstedt, Nümbrecht, Германия	Номер для заказа
0,5 мл пробирки с прикручивающимися крышками	72.730.105
1,5 мл пробирки с прикручивающимися крышками	72.692.005

Технические характеристики

Диагностическая характеристика

Клинические легочные образцы

Диагностически значимые технические характеристики набора **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 были определены в процессе изучения [12] 338 образцов (включая мокроту, бронхо-альвеолярные смывы и плевральные аспираты) в сравнении с культурой (успешное культивирование на плотной среде Loewenstein-Jensen или на MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA), с последующим определением вида при помощи набора **GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0) и проверка фенотипической лекарственной чувствительности (drug susceptibility testing - (DST)).

Дополнительно эти образцы были проверены микроскопически. При оценке принимались во внимание и клинические данные пациента.

Сайт изучения находился в стране с высокой нагрузкой туберкулезом с множественной лекарственной резистентностью (MDR-TB). На месте проводились методы микроскопии и культивирования. Аликвоты образцов мокроты, деконтаминированной, были направлены во вторую лабораторию, для выполнения экстракции ДНК и **GenoType MTBDRplus** VER 2.0. Мануальное выделение ДНК проводилось набором **GenoLyse**® kit (162 из 338 образцов мокроты), автоматизированное выделение ДНК было выполнено на **GenoXtract**® с использованием набора **GXT DNA/RNA Extraction Kit** (176 из 338 образцов мокроты) согласно соответствующим инструкциям по применению.

Конгруэнтные положительные и клинически положительные результаты **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 были определены либо по положительности культуры и **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 или только по тому, что **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 был положительным, а культура отрицательной, но ТБ был выявлен предыдущими исследованиями, основанными на культивировании в образцах от соответствующих пациентов. Противоречивые результаты (**GenoType MTBDRplus** VER 2.0 положительный, а культура – отрицательный) не исключают во всех случаях ТБ инфекцию у пациентов, поскольку у некоторых пациентов не были доступны данные о возможности ТБ инфекции.

Таблица 1: Технические характеристики набора **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 для выявления **MTBC** в легочных клинических образцах в сравнении с культурой/**GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0 (GT Мусо CM) и клинические данные

GenoLyse®	GenoType MTBDRplus VER 2.0	Положительная мокрота		Чувств: 100% Спец: /* ППЗ: 100% ПОЗ: /*	
		культура/GT Мусо СМ и клин			
		положительные	39		0
		отрицательные	0		1
GenoLyse®	GenoType MTBDRplus VER 2.0	Отрицательная мокрота		Чувств: 80,3% Спец: 98,4% ППЗ: 98,0% ПОЗ: 83,3%	
		культура/GT Мусо СМ и клин			
		положительные	49		1
		отрицательные	12		60
GXT	GenoType MTBDRplus VER 2.0	Положительная мокрота		Чувств: 97,5% Спец: /* ППЗ: 97,5% ПОЗ: /*	
		культура/GT Мусо СМ и клин			
		положительные	39		1
		отрицательные	1		0
GXT	GenoType MTBDRplus VER 2.0	Отрицательная мокрота		Чувств: 78,3% Спец: 96,0% ППЗ: 94,0% ПОЗ: 84,7%	
		культура/GT Мусо СМ и клин			
		положительные	47		3
		отрицательные	13		72

Чувств, диагностическая чувствительность; Спец, диагностическая специфичность; ППЗ, предварительно положительное значение;

ПОЗ, предварительно отрицательное значение

* Нет значения по причине малого количества проб

Для оценки выявленной резистентности, было использовано 156 образцов (78 **GenoLyse**® изолятов и 78 **GXT** изолятов) которые оказались **MTBC**-положительными и при культивировании и на наборе **GenoType MTBDRplus** VER 2.0.

Таблица 2: Технические характеристики набора **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 для выявления **RMP резистентности** в пульмонарных образцах в сравнении с культурой/DST

GenoLyse®	GenoType MTBDRplus VER 2.0	Положительная мокрота		Чувств: 100% Спец: 92,3% ППЗ: 96,2% ПОЗ: 100%	Отрицательная мокрота		Чувств: 96,0% Спец: 93,3% ППЗ: 96,0% ПОЗ: 93,3%		
		культура/DST			культура/DST				
		RMP-R	RMP-S		RMP-R	RMP-S			
		RMP-R	25		1	RMP-R		24	1
		RMP-S	0	12		RMP-S	1	14	
GXT	GenoType MTBDRplus VER 2.0	культура/DST		Чувств: 96,3% Спец: 100% ППЗ: 100% ПОЗ: 92,3%	культура/DST		Чувств: 86,2% Спец: 100% ППЗ: 100% ПОЗ: 71,4%		
		RMP-R	RMP-S		RMP-R	RMP-S			
		RMP-R	26		0	RMP-R		25	0
		RMP-S	1		12	RMP-S		4	10

Чувств, диагностическая чувствительность; Спец, диагностическая специфичность; ППЗ, предварительно положительное значение;

ПОЗ, предварительно отрицательное значение; RMP-R, резистентность к рифампицину; RMP-S, чувствительность к рифампицину

Таблица 3: Технические характеристики набора **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 для выявления INH резистентности в пульмонарных клинических образцах в сравнении с культурой/DST

		Положительная мокрота			Чувств: 96,7% Спец: 87,5% ППЗ: 96,7% ПОЗ: 87,5%	Отрицательная мокрота			Чувств: 96,7% Спец: 90,0% ППЗ: 96,6% ПОЗ: 90,0%
		культура/DST				культура/DST			
		INH-R	INH-S			INH-R	INH-S		
GenoLyse®	GenoType MTBDRplus	INH-R	29	1		INH-R	29	1	
	VER 2.0	INH-S	1	7		INH-S	1	9	
GXT		культура/DST			Чувств: 100% Спец: 100% ППЗ: 100% ПОЗ: 100%	культура/DST			Чувств: 90,6% Спец: 71,4% ППЗ: 93,5% ПОЗ: 62,5%
		INH-R	INH-S			INH-R	INH-S		
		INH-R	28	0			INH-R	29	
	GenoType MTBDRplus	INH-S	0	11		INH-S	3	5	
	VER 2.0								

Чувств, диагностическая чувствительность; Спец, диагностическая специфичность; ППЗ, предварительно положительное значение; ПОЗ, предварительно отрицательное значение; INH-R, резистентность к изониазиду; INH-S, чувствительность к изониазиду

Культуральный материал

Диагностически значимые технические характеристики набора **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 были определены в процессе изучения 74 культивированных образцов в сравнении с **GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0 и проверкой фенотипической лекарственной чувствительности (drug susceptibility testing - (DST)). Сайт изучения находился в стране с низкой нагрузкой MDR-TB. Мануальное выделение ДНК проводилось набором **GenoLyse®** китв соответствие с инструкцией по применению. Было проверено 74 культуры, 49 оказались положительными на комплекс *M. tuberculosis* complex (MTBC) и на 25 появился пророст не-туберкулезных микобактерий. Таким образом, для выявления резистентности в культивированном материале, было доступно 49 изолятов.

Таблица 4: Технические характеристики набора **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 для выявления MTBC в культивированном материале в сравнении с культурой/GenoType Mycobacterium CM VER 1.0 (GT Мусо CM)

		культура/GT Мусо CM		Чувств: 100% Спец: 100% ППЗ: 100% ПОЗ: 100%
		положительные	отрицательные	
GenoType MTBDRplus	положительные	49	0	
	отрицательные	0	25	
VER 2.0				

Чувств, диагностическая чувствительность; Спец, диагностическая специфичность; ППЗ, предварительно положительное значение; ПОЗ, предварительно отрицательное значение

Таблица 5: Технические характеристики набора **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 для выявления RMP резистентности в культивированном материале в сравнении с культурой/DST

		культура/DST		Чувств: /* Спец: 100% ППЗ: /* NPV: 100%
		RMP-R	RMP-S	
GenoType MTBDRplus	RMP-R	0	0	
	RMP-S	0	49	
VER 2.0				

Чувств, диагностическая чувствительность; Спец, диагностическая специфичность; ППЗ, предварительно положительное значение; ПОЗ, предварительно отрицательное значение; RMP-R, резистентность к рифампицину; RMP-S, чувствительность к рифампицину

* Нет значения по причине малого количества проб.

Таблица 6: Технические характеристики набора **GenoType MTBDRplus** для выявления INH резистентности в культивированном материале в сравнении с культурой/DST

		культура/DST		Чувств: /* Спец: 100% ППЗ: /* NPV: 100%
		INH-R	INH-S	
GenoType MTBDRplus	INH-R	3	0	
	INH-S	0	46	
VER 2.0				

Чувств, диагностическая чувствительность; Спец, диагностическая специфичность; ППЗ, предварительно положительное значение; ПОЗ, предварительно отрицательное значение; INH-R, резистентность к изониазиду; INH-S, чувствительность к изониазиду.

* Нет значения по причине малого количества проб.

Аналитические характеристики

Аналитическая специфичность

Специфичность теста **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 обеспечена за счёт точного дизайна и специфичных праймеров и зондов, которые сочетаются помимо прочего по сравнению гомологичности последовательностей, опубликованной в генетической базе данных и по строгим условиям реакции.

Аналитическая специфичность была определена на 61 ДНК изолятах, включая следующие MTBC штаммы: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti*, и *M. pinnipedii* (все RMP- и INH-чувствительные). Были проанализированы следующие штаммы, неулавливаемые системой: *Actinomyces naeslundii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *C. bovis*, *C. durum*, *Escherichia coli*, *Gordona rubropertinctus*, *Klebsiella oxytoca*, *Mycobacterium abscessus*, *M. alvei*, *M. asiaticum*, *M. avium*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. chimaera*, *M. fortuitum* (2 sequevars), *M. frederiksbergense*, *M. gastri*, *M. genavense*, *M. goodii*, *M. gordonae*, *M. heckeshornense*, *M. immunogenum*, *M. interjectum*, *M. intermedium*, *M. intracellulare*, *M. lentiflavum*, *M. marinum*, *M. mucogenicum*, *M. palustre*, *M. peregrinum*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoidei*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. szulgai*, *M. triplex*, *M. ulcerans*, *M. xenopi*, MRSA, *Nocardia abscessus*, *N. africana*, *N. amarae*, *N. asteroides*, *N. farcinica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Rhodococcus erythropolis*, *Saccharomonospora glauca*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Tsukamurella inchoensis*, *T. pulmonis*.

Шесть изолятов MTBC были правильно идентифицированы, как RMP- и INH-чувствительные MTBC штаммы. Остальные 55 изолятов показали отсутствие TUB полоски и неопределяемую полоску для RMP и INH резистентности. Поэтому достигнутая аналитическая специфичность оказалась 100%.

Аналитическая чувствительность (Предел детекции, LOD)

Для определения аналитической чувствительности набора **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 в клинических образцах, десять параллельных культур БЦЖ были разбавлены и обогащены в MTBC-отрицательных образцах (конечные концентрации в образцах мокроты: 1000, 500, 160 и 100 КОЕ/мл). Включительно с отрицательным контролем, выделение ДНК проводили на наборе **GenoLyse®** и один раз использовали **GXT DNA/RNA Extraction Kit**, после чего тестировали на **GenoType MTBDRplus** VER 2.0, применяя протокол «MDR DIR» ПЦР. Предел детекции 160 КОЕ/мл был установлен на обоих методах экстракции.

Для определения аналитической чувствительности набора **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 в культуральных образцах, 4 BCG культуры (RMP- и INH-чувствительных, $1,6 \times 10^4$, $1,6 \times 10^3$, $1,6 \times 10^2$, и 100 КОЕ/мл) были проверены в трёх повторностях. Включительно с отрицательным контролем, выделение ДНК проводили на наборе **GenoLyse®** и тестировали на наборе **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 применяя протокол «MDR CUL» ПЦР. Был установлен предел детекции $1,6 \times 10^4$ КОЕ/мл.

Воспроизводимость

Для того чтобы определить внутри-лабораторную точность, **GenoType MTBDRplus** VER 2.0, две культуры BCG (RMP- и INH-чувствительные, 1 500 и 150 КОЕ/мл) и культура *M. avium* (10 000 КОЕ/мл) были протестированы в трёх повторностях, и использовались для обогащения отрицательных образцов мокроты. Эти образцы и отрицательный контроль тестировались на **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 в похожих условиях, с использованием протокола «MDR DIR» ПЦР. Выделение ДНК выполнялось один раз на **GenoLyse® DNA extraction kit**, и один раз с использованием **GXT DNA/RNA Extraction Kit**. Все параллельные реплики продемонстрировали появление идентичных и правильных полосок и сравнимую интенсивность сигнала. Более того: интенсивность сигнала была сравнима между двумя методами выделения ДНК и между разными разведениями одного и того же образца. Таким образом, достигнутая внутри-лабораторная точность оказалась 100%.

Для того чтобы определить меж-лабораторную точность **GenoType MTBDRplus** VER 2.0, две культуры BCG (RMP- и INH-чувствительные, 1 500 и 150 КОЕ/мл) и культура *M. avium* (10 000 КОЕ/мл) были протестированы в трёх повторностях, и использовались для обогащения отрицательных образцов мокроты. Эти образцы и отрицательный контроль тестировались в девяти прогонах: в течение трёх разных дней, на трёх разных наборах аппаратов, и выполняли их три разных оператора. Выделение ДНК выполнялось один раз на **GenoLyse® DNA extraction kit**, и один раз с использованием **GXT DNA/RNA Extraction Kit**. Для ПЦР использовался протокол «MDR DIR» ПЦР. Помимо варьирующего параметра, все остальные условия тестирования были идентичными. Не было выявлено отклонений между параллельными образцами, т.е. полоски между прогонами были идентичными и правильными и интенсивность сигнала – сравнимая. Более того, интенсивность сигнала оказалась сравнимой между различными методами выделения ДНК и разными концентрациями бактерий. Таким образом, достигнутая меж-лабораторная точность оказалась 100%.

Интерферирующие вещества

Есть вещества, которые могут ингибировать ПЦР реакции. Такие ингибиторы могут быть к примеру, происхождением из культуральной среды. Чтобы понять, влияет ли среда на **GenoType MTBDRplus** VER 2.0, 6 разных образцов комплекса *M. tuberculosis* (4 RMP- и INH-резистентных, 2 RMP- и INH-чувствительных) были культивированы на 4 разных средах (плотная среда: Loewenstein-Jensen, Stonebrink, и Middlebrook-7H10, жидкая среда: MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)). ДНК выделяли из культуральных образцов, используя набор **GenoLyse® DNA extraction kit** и за тем тестировали набором **GenoType MTBDRplus** VER 2.0.

Все образцы комплекса *M. tuberculosis* продемонстрировали одинаковые правильные результаты. Таким образом, можно исключить, что тестируемая среда переносит ингибиторы в тест **GenoType MTBDRplus** VER 2.0.

Из материала образцов, так же могут переноситься ингибирующие вещества. Таким образом, вещества, перечисленные в таблице 7, были проверены, на предмет потенциальной интерференции с набором **GenoType MTBDRplus** VER 2.0. Определённые разведения BCG культуры выше и в пределах детекции были обогащены различными количествами потенциальных ингибиторов. Во всех образцах проводили выделение ДНК с использованием **GenoLyse® DNA extraction kit**. Тогда разведения культур были протестированы на **GenoType MTBDRplus** VER 2.0.

Таблица 7: Протестированные потенциально интерферирующие с **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 вещества

Вещество/класс	Описание/Активный компонент	Тестовая концентрация (ии)
Средства лечения аллергии	Масло чайного дерева	0,008% об/об до 0,5% об/об
Анестетики (эндотрахеальная интубация)	Лидокаин HCl 4%	20% об/об; 30% об/об
Анестетики (оральные)	Бензокаин 20%	5% в/об
Антибиотики (мази для носа)	Мупирицин	1,2 мг/мл; 2,4 мг/мл
Антибиотики (синтетические)	Амоксициллин	2,2 µг/мл
Антитуберкулёзные препараты	Изониазид 1 мг/мл	50 µг/мл
Антитуберкулёзные препараты	Рифампицин 1 мг/мл	25 µг/мл
Антитуберкулёзные препараты	Пиразинамид 10 мг/мл	100 µг/мл
Антитуберкулёзные препараты	Этамбутол 1 мг/мл	5 µг/мл; 50 µг/мл
Антитуберкулёзные препараты	Стрептомицин 1 мг/мл	25 µг/мл
Противовирусные препараты	Цанамивир	800 µг/мл
Кровь	Цельная кровь	0,2% об/об до 5% об/об
Кровь	Гемоглобин	0,05% об/об to 0,3% об/об
Бронхорасширители	Теофиллин	222 пмоль/мл
ДНК (человека)		10 µг/мл
Отхаркивающие (оральные)	Гуаифенезин 400 мг/пил	2,5 мг/мл; 5 мг/мл
Желудочный сок	0,5% HCl, 0,1 M KCl, 0,1 M NaCl, pH 1-2	5% об/об
Вакцина против гриппа назальный спрей (FluMist®)	Живая аттенуированная вакцина против гриппа	5% об/об
Ингаляционные бронхорасширители	Сальбутамол сульфат 2,5 мг/3 мл	50 µг/мл; 100 µг/мл
Растворы для полоскания рта/горла	Листерин (эукалиптол 0,029%, ментол 0,042%, метилсалицилат 0,06%, тимол 0,064%, денатурированный спирт 20%)	20% об/об
Муцин: бычий, подчелюстной железы, тип I-S	Очищенный белок муцин 5% в/об	1,5% в/об; 5% в/об
Назальные кортикостероиды	Дексаметазон	1,52 пмоль/мл
Назальный гель (гомеопатический)	Сера	5% в/об
Назальный спрей или капли	Фенилэфрин 0,5%	25% об/об; 100% об/об
Раствор для небулайзера (гипертонический раствор)	NaCl	3% в/об; 5% в/об
Физиологический раствор	NaCl (0,9%)	0,9% в/об
Препараты для лечения от <i>Pneumocystis jiroveci</i>	Пентамидин	300 нг/мл
Гной		0,2% об/об до 5% об/об
Реагенты для обработки образца	NALC-NaOH (N-ацетил-L-цистеин-натрия гидрохлорид)	0,5% об/об; 1% об/об
Табак	Никогель (40% экстракт табака)	0,5% в/об

Ингибция **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 (недействительные результаты тестирования) была отмечена в присутствии следующих веществ и в ниже указанных концентрациях: цельная кровь при 0,6%, гемоглобин при 0,1%, гной при 2%, лидокаин при 30%, мупироцин при 2,4 мг/мл, масло чайного дерева при 0,5%, и гуафенизин при 5 мг/мл.

Стабильность

Срок годности тестового набора при рекомендуемых условиях хранения указан на упаковке.
Стабильность определялась согласно требованиям DIN EN ISO 23640.

Список литературы

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. WHO/HTM/TB/2018.20 World Health Organization, Geneva, Switzerland 2018.
2. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13: 1320–1330.
3. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th edition. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 2009.
4. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards), USA, Document M29 (please refer to the latest version).
5. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 1985.
6. Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA 1992.
7. Richter E, Beer J, Diel R, Hillemann D, Hoffmann H, Klotz M, Mauch H, Rüsche-Gerdes S. MiQ 5, Tuberkulose, Mykobakteriose. In: Podbielski A, Herrmann M, Kniehl E, Mauch H, Rüssmann H (eds): Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards. Elsevier, Munich, Germany 2010.
8. DIN, Deutsches Institut für Normung e.V. (ed). DIN 58943-4:2009-02: Medical microbiology - Diagnosis of tuberculosis - Part 4: Primary samples for the diagnosis of tuberculosis and mycobacteria – Qualitative and quantitative requirements, extraction, transport and storage. Beuth, Berlin, Germany 2009.
9. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993; 341: 647-650.
10. Alonso M, Palacios JJ, Herranz M, Penedo A, Menéndez A, Bouza E, García de Viedma D. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassignment of resistance category. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2688-2690.
11. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 496-514.
12. Crudu V, Stratan E, Romancenco E, Allerheiligen V, Hillemann A, Moraru N. First evaluation of an improved assay for molecular genetic detection of tuberculosis as well as RMP and INH resistances. *J Clin Microbiol* 2012; Epub ahead of print, doi:10.1128/JCM.05903-11.

Важные изменения в инструкции IFU-304A-09

Глава	Изменения
Реагенты и инструменты, Информация для заказа	Следует избегать замораживания и оттаивания составляющих набора более четырех раз. В случае необходимости аликвотируйте реагенты, используя подходящие пробирки с закручивающимися крышками.
Оценка и интерпретация результатов	Новое: „В случае наличия общей сильной интенсивности сигнала, но при наличии только слабого окрашивания или при отсутствии полосы Контроля Амплификации, нельзя оценить одну полосу дикого типа, демонстрирующую значительно более слабое окрашивание, чем другие полосы дикого типа соответствующего локуса (или полосы Контроля Локуса для <i>katG</i>).“



Hain Lifescience GmbH

Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany
www.hain-lifescience.de, +49 (0) 74 73- 94 51- 0

GenoType MTBDRsl

VER 2.0

Instructions for Use

IFU-317A-04



IVD for in vitro diagnostic use only

GenoType MTBDRsl VER 2.0

Molecular Genetic Assay for Identification of the *M. tuberculosis* Complex and its Resistance to Fluoroquinolones and Aminoglycosides/Cyclic Peptides from Sputum Specimens or Cultivated Samples

Please read the instructions on hand completely and carefully before using the kit. Strictly adhere to the established procedure to obtain correct test results.

Intended Use

The **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 is a qualitative in vitro test for the identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to fluoroquinolones (FLQ; e.g. ofloxacin and moxifloxacin) and aminoglycosides/cyclic peptides (AG/CP; injectable antibiotics such as kanamycin, amikacin, capreomycin, and viomycin) from smear-positive or -negative sputum specimens and cultivated samples. The following species are included in the tuberculosis (TB)-causing *M. tuberculosis* complex: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. canettii*, and *M. pinnipedii*. The detection of FLQ resistance is enabled by the detection of the most significant resistance-associated mutations of the *gyrA* and *gyrB* genes (coding for the A-subunit and the B-subunit of the DNA gyrase, respectively). For detection of AG/CP resistance, the 16S rRNA gene (*rrs*) is examined, for detection of low-level kanamycin resistance, the promoter region of the *eis* gene (coding for the acetyltransferase Eis) is examined. The test is indicated as an aid for diagnosis and intended for use in medical laboratories.

Summary and Explanation

Tuberculosis (TB) is a bacterial infectious disease passed on by droplet infection. In 2014, there were an estimated 9.6 million incident cases of TB globally, and an estimated 1.5 million TB deaths [1]. TB treatment requires a therapy over several months. Emergence and spread of drug-resistant tuberculosis is a major medical and public problem threatening global health. Multidrug-resistant (MDR-)TB is defined as TB that is resistant at least to the first-line drugs rifampicin and isoniazid. The other anti-TB drugs referred to as first-line drugs are pyrazinamide, ethambutol, and streptomycin. All other anti-TB drugs are generally referred to as second-line drugs. Extensively drug-resistant (XDR-)TB is defined as TB that is resistant to rifampicin and isoniazid and additionally to at least one of the fluoroquinolones and an injectable second-line antibiotic (such as kanamycin and amikacin (both AG), or capreomycin and viomycin (both CP)) [2]. Due to its complex diagnosis and obstacles in treatment, XDR-TB is a major challenge to TB control.

As long as XDR-TB is not verified, use of inadequate and hence ineffective antibiotics may lead to further spread of resistant bacteria and amplification of resistance. Therefore, rapid diagnosis and identification of XDR-TB is a prerequisite for appropriate treatment. Each DNA extracted from sputum or a cultivated sample using the **GenoLyse**® kit can be used for amplification with the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 kit (e.g. subsequent to the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0).

Principles of the Procedure

The **GenoType MTBDRsl** test is based on the **DNA•STRIP** technology. The whole procedure is divided into three steps: (i) DNA extraction from NALC-NaOH-decontaminated sputum specimens or cultured material (solid/liquid medium) – the necessary reagents are not included in the kit, (ii) a multiplex amplification with biotinylated primers, and (iii) a reverse hybridization.

All reagents needed for amplification, such as polymerase and primers, are included in the Amplification Mixes A and B (AM-A and AM-B) and are optimized for this test. The membrane strips are coated with specific probes complementary to the amplified nucleic acids. After chemical denaturation, the single-stranded amplicons bind to the probes (hybridization). Highly specific binding of complementary DNA strands is ensured by stringent conditions which result from the combination of buffer composition and a certain temperature. Thus, the probes reliably discriminate several sequence variations in the gene regions examined. The streptavidin-conjugated alkaline phosphatase binds to the amplicons' biotin via the streptavidin moiety. Finally, the alkaline phosphatase transforms an added substrate into a dye which becomes visible on the membrane strips as a colored precipitate. A template ensures the easy and fast interpretation of the banding pattern obtained.

Reagents and Instruments

Kit contents

Order no. Tests	317A 12	31796A 96
Kit Component 1 of 2 (store at 2°C to 8°C)		
Membrane strips coated with specific probes (MTBDRsl VER 2.0 STRIPS)	12	2x 48
Denaturation Solution (DEN) contains <2% NaOH, dye	240 µl	2x 960 µl
Hybridization Buffer (HYB) contains <10% anionic tenside, dye	12 ml	96 ml
Stringent Wash Solution (STR) contains >25% of a quaternary ammonium compound, <1% anionic tenside, dye	12 ml	96 ml
Rinse Solution (RIN) contains buffer, <1% NaCl, <1% nonionic tenside	36 ml	3x 96 ml
Conjugate Concentrate (CON-C) contains streptavidin-conjugated alkaline phosphatase, dye	120 µl	960 µl
Conjugate Buffer (CON-D) contains buffer, 1% blocking reagent, <1% NaCl	12 ml	96 ml
Substrate Concentrate (SUB-C) contains <70% dimethyl sulfoxide, <10% 4-nitro blue tetrazolium chloride, <10% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate	120 µl	960 µl
Substrate Buffer (SUB-D) contains buffer, <1% MgCl ₂ , <1% NaCl	12 ml	96 ml
Tray, evaluation sheet	1 of each	4 of each
Instructions for use, template	1 of each	1 of each
Lot label	3	3
Kit Component 2 of 2 (store at –20°C to –18°C)		
Amplification Mix A (AM-A GT MTBDRsl VER 2.0) contains buffer, nucleotides, Taq polymerase	120 µl	4x 240 µl
Amplification Mix B (AM-B GT MTBDRsl VER 2.0) contains salts, specific primers, dye	420 µl	4x 840 µl

Storage and disposal of kit constituents

1/2 Kit Component 1 of 2

2/2 Kit Component 2 of 2

Store all constituents from Kit Component 1 at 2°C to 8°C. Store all constituents from Kit Component 2 at –20°C to –18°C and keep strictly separated from contaminating DNA. Avoid repeated freezing and thawing of AM-A and AM-B; when processing only small sample numbers per run, aliquot AM-A and AM-B. Do not use the reagents beyond their expiry date. Dispose of unused reagents and waste in accordance with federal, state, and local regulations.

Precautions for handling kit constituents

Observe all federal, state, and local safety and environmental regulations. Always wear suitable protective clothing and gloves.

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

Hybridization Buffer (**HYB**) and Substrate Concentrate (**SUB-C**) are not classified as hazardous. Due to their ingredients, however, hazard statement EUH210 applies: Safety data sheet available on request.



Denaturation Solution (**DEN**) contains <2% sodium hydroxide.

Warning!

H315: Causes skin irritation. H319: Causes serious eye irritation.

P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection. P305+351+338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.

Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. P313: Get medical advice/attention.

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

Conjugate Concentrate (**CON-C**) and Conjugate Buffer (**CON-D**) contain biological material. Hence, they must be considered as potentially infectious and must be handled accordingly (e.g. see [3] or [4]).

Materials required but not included in the kit

- Absorbent paper
- Adjustable pipettes for 10, 20, 200, and 1000 µl
- Class II safety cabinet
- Disposable gloves
- Disposable sterile pipette tips with filter
- DNA extraction kit (**GenoLyse**®, see chapter Ordering Information) as well as necessary equipment
- Graduated cylinder
- PCR tubes, DNase- and RNase-free
- Reagents for cultivation of mycobacteria as well as necessary equipment (when cultivated samples are to be used)
- Sample decontamination reagents as well as necessary equipment
- Shaking water bath + shaking platform **or TwinCubator** (instrument for manual hybridization) **or** automated hybridization instrument
- Thermal cycler
- Timer
- Tweezers
- Water (distilled)
- Water (molecular biology grade; for negative controls)

Quality Control

In order to control the correct performance of the test and the proper functioning of kit constituents, each strip includes 6 control zones:

- a Conjugate Control zone (CC) to check the binding of the conjugate on the strip and a correct chromogenic reaction
- an Amplification Control zone (AC) to check for a successful amplification reaction
- four Locus Control zones (*gyrA*, *gyrB*, *rrs*, and *eis*) checking the optimal sensitivity of the reaction for each of the tested gene loci

Observe the usual precautions for amplification setup. It is essential that all materials (such as pipette tips) coming in contact with the reagents are free from DNases. Do not interchange or pool Amplification Mixes or membrane strips from different kits unless the lots are identical. You can find the kit lot and the corresponding lots of the kit constituents on the lot labels included in the kit.

A negative control sample for detection of possible contamination events containing water (molecular biology grade) instead of DNA should be part of each test run; the respective test strip should show the bands CC and AC only.

Specimen Requirements

NALC-NaOH-decontaminated smear-positive or -negative sputum samples as well as cultivated samples (solid/liquid medium) can be used as starting material for DNA extraction. Until the present edition of the instructions on hand, the performance of the test has not been validated with other sample materials.

Precautions for handling specimens

Patient specimens must always be considered as potentially infectious and must be handled accordingly (e.g. see [3] or [4]). Always wear suitable protective clothing and gloves. Samples from patients at risk (infected by pathogenic microorganisms including Hepatitis B and Human Immunodeficiency Virus (HIV)) must always be labeled and handled under suitable safety conditions according to institutional guidelines. Patient specimens must be centrifuged in a class II safety cabinet or in an aerosol-tight rotor. Open aerosol-tight rotor in safety cabinet only. For inactivated samples, a standard rotor can be used for centrifugation outside the safety cabinet.

Positive culture samples are infectious and must always be handled in a class II safety cabinet and according to the CDC publication "Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory" [5].

Discard used pipette tips immediately after use in a container for biohazardous waste. After finishing the assay, discard all used disposables in a container for biohazardous waste.

Storage and transport

All specimens should be collected and transported as recommended in the CDC publication "Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory" [5], the "Clinical Microbiology Procedures Handbook" [6], or your laboratory procedure manual.

It must be ensured that until decontamination, specimens are kept in sterile plastic containers at a temperature of 2°C to 8°C. The transport of specimens at room temperature has to be carried out as soon as possible and should be done within 1-2 days [7,8]. Specimens used for decontamination must not be older than 4 days.

After decontamination and subsequent resuspension of the bacteria pellet with phosphate buffer, samples can be stored at –20°C or –80°C for a maximum of 5 days until performing DNA extraction.

Preparation

Clinical specimens must be processed using the NALC/NaOH method according to the CDC publication "Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory" [5].

After decontamination, the cell pellet should be resuspended in a maximum of 1 to 1.5 ml of phosphate buffer. When testing patient specimens, higher volumes might hamper the sensitivity of the test. Due to the potential inhomogeneity of the specimen, the decontaminated sample must be mixed before removing the aliquot to be analyzed; otherwise the sensitivity of the test might be influenced.

When the sample is to be cultivated, cultivation can be performed either on solid medium (e.g. Loewenstein-Jensen, Middlebrook) or in liquid medium (e.g. MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)).

DNA Extraction

NALC-NaOH-decontaminated smear-positive or -negative sputum samples as well as mycobacteria grown on solid medium (e.g. Loewenstein-Jensen, Middlebrook) or in liquid medium (e.g. MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)) can be used as starting material for DNA extraction. The working area must be free from contaminating DNA.

For DNA extraction from NALC-NaOH-decontaminated clinical specimens or cultured material, the **GenoLyse**® kit (see chapter Ordering Information) is used according to protocol A.

The method described above was used for performance evaluation of the **GenoType MTBDRsl** test. Until the present edition of the instructions on hand, the performance of the test has not been validated with other DNA extraction methods or sample materials.

Each DNA extracted from sputum or a cultivated sample using the **GenoLyse**® kit can be used for amplification with the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 kit (e.g. subsequent to the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0).

Amplification

All reagents needed for amplification, such as polymerase and primers, are included in the Amplification Mixes A and B (AM-A and AM-B) and are optimized for this test. After thawing, spin down AM-A and AM-B briefly and mix carefully by pipetting up and down. Pipette AM-A and AM-B only in a room free from contaminating DNA. The DNA solution should be added in a separate working area.

Prepare for each sample:

- 10 µl AM-A (see Kit Component 2)
- 35 µl AM-B (see Kit Component 2)
- 5 µl DNA solution

Final volume: 50 µl

Determine the number of samples (number of samples to be analyzed plus control samples). Prepare the number of tubes needed. Prepare a master mix containing AM-A and AM-B and mix carefully but thoroughly (do not vortex). Alternatively, the content of an AM-A reaction tube may completely be transferred to an AM-B reaction tube. This will lead to master mix sufficient for 12 amplification reactions (12 tests kit) or for 4x 24 amplification reactions (96 tests kit). Please note that the master mix needs to be prepared freshly each time. Aliquot 45 µl into each of the prepared PCR tubes and add 5 µl water (molecular biology grade) to one aliquot (negative control). In a separate working area, add 5 µl DNA solution to each aliquot (except for negative control).

Amplification profile:

When using a thermal cycler from Hain Lifescience with the respective preinstallation, select protocol "MDR DIR" for clinical specimens or protocol "MDR CUL" for cultivated samples.

		Clinical specimens	Cultivated samples
15 min	95°C	1 cycle	1 cycle
30 sec	95°C	20 cycles	10 cycles
2 min	65°C		
25 sec	95°C	30 cycles	20 cycles
40 sec	50°C		
40 sec	70°C		
8 min	70°C	1 cycle	1 cycle
Heating rate		0.2°C/sec	0.2°C/sec

Amplification products can be stored at -20°C to +8°C.

Hybridization

When using a hybridization instrument from Hain Lifescience, please refer to the document "Overview equipment programs" available on www.hain-lifescience.com for the name of the hybridization protocol to be used.

The following protocol describes the manual hybridization using a water bath or a **TwinCubator**.

Preparation

Prewarm shaking water bath to **45°C** (the maximum tolerated deviation from the target temperature is +/-1°C) or switch on **TwinCubator**. Prewarm solutions HYB and STR to 37°C to 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 solution. 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.**

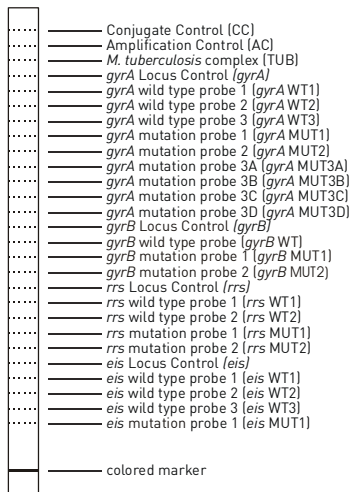
Depending on the test conditions (e.g. room temperature), the substrate incubation time, i.e. the time until the bands are clearly visible, can vary between 3 and 20 minutes. Extended substrate incubation times can lead to increased background staining and might impair interpretation of the results.

13. **Stop reaction as soon as bands are clearly visible 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 included in the kit. 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. For technical reasons the distances between single probes on the strips may vary slightly. **For an accurate evaluation therefore please use the provided template and align it – separately for each locus – with the respective Locus Control band.** Determine the resistance status and note down in the respective column. As a help for interpretation, evaluation examples are given below. Each strip has a total of 27 reaction zones (see figure).



Note: The strip is not displayed in original size.

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.

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 of the single reactions during amplification. In this case the test was performed correctly and does not have to be repeated.

When only the CC and AC bands are developed, this represents a valid negative result. A missing AC band in case of a negative test result indicates mistakes during setup and/or performance of the amplification reaction, or presence of amplification inhibitors. In this case, the test result is not valid and the test has to be repeated with the respective sample.

M. tuberculosis complex (TUB)

This zone hybridizes with amplicons generated from all members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. If the TUB zone is negative while no evaluable resistance pattern is developed, the tested specimen does not contain bacteria belonging to the *M. tuberculosis* complex and cannot be evaluated by this test system.

Locus Controls (*gyrA*, *gyrB*, *rrs*, *eis*)

The Locus Control zones detect gene regions specific for the respective locus. In case of a positive test result (evaluable wild type and mutation banding pattern), the signals of the Locus Control bands may be weak.

gyrA

Both the *gyrA* and *gyrB* genes are examined for detection of resistance to FLQ (e.g., ofloxacin or moxifloxacin).

The wild type probes comprise the most important resistance regions of the *gyrA* gene (see table 1). When all wild type probes stain positive, there is no detectable mutation within the examined region. In case of a mutation, the respective amplicon cannot bind to the corresponding wild type probe resulting in the absence of the wild type probe signal.

The mutation probes detect some of the most common resistance-mediating mutations (see table 1).

Each pattern deviating from the wild type pattern (see evaluation example 1) indicates resistance to FLQ of the tested strain.

Table 1: Mutations in the *gyrA* gene and the corresponding wild type and mutation bands (according to [9,10,11,12])

Failing wild type band	Developing mutation band	Mutation	Phenotypic resistance
<i>gyrA</i> WT1	-	G88A	FLQ
		G88C	
<i>gyrA</i> WT2	<i>gyrA</i> MUT1	A90V	
	<i>gyrA</i> MUT2	S91P	
<i>gyrA</i> WT3	<i>gyrA</i> MUT3A	D94A	
		D94N	
	<i>gyrA</i> MUT3B	D94Y	
	<i>gyrA</i> MUT3C	D94G	
	<i>gyrA</i> MUT3D	D94H ¹⁾	

¹⁾ This rare mutation has only been detected theoretically (in silico).

gyrB

Both the *gyrA* and *gyrB* genes are examined for detection of resistance to FLQ (e.g., ofloxacin or moxifloxacin).

The wild type probe comprises the most important resistance region of the *gyrB* gene (see table 2). When the wild type probe stains positive, there is no detectable mutation within the examined region. In case of a mutation, the respective amplicon cannot bind to the wild type probe resulting in the absence of the wild type probe signal.

The mutation probes detect the most common resistance-mediating mutations (see table 2). Additional mutations within the examined *gyrB* gene region that cause a failing wild type band but are not detected by the mutation probes may also lead to FLQ resistance [13].

Table 2: Mutations in the *gyrB* gene and the corresponding wild type and mutation bands (according to [13])

Failing wild type band	Developing mutation band	Mutation ¹⁾	Phenotypic resistance
<i>gyrB</i> WT	<i>gyrB</i> MUT1	N538D	FLQ
	<i>gyrB</i> MUT2	E540V	

¹⁾ Amino acid positions are numbered according to [14].

rrs

The *rrs* gene is examined for detection of cross-resistance to AG/CP antibiotics such as kanamycin (KAN) and amikacin (AMK), both AG, or capreomycin (CAP) and viomycin (VIO), both CP.

The wild type probes comprise the most important resistance regions of the *rrs* gene (see table 3). When both wild type probes stain positive, there is no detectable mutation within the examined region. In case of a mutation, the respective amplicon cannot bind to the corresponding wild type probe resulting in the absence of the wild type probe signal.

The mutation probes detect the most common resistance-mediating mutations (see table 3).

Each pattern deviating from the wild type pattern (see evaluation example 1) indicates an AG/CP resistance of the tested strain. The detectable cross-resistances are shown in the table below.

Table 3: Mutations in the *rrs* gene, the corresponding wild type and mutation bands, and the resulting cross-resistances (according to [15,16])

Failing wild type band	Analyzed nucleic acid position	Developing mutation band	Mutation	Phenotypic resistance				See figure 1
<i>rrs</i> WT1	1401	<i>rrs</i> MUT1	A1401G	KAN	AMK	CAP	VIO	example 2 and 6
	1402	-	C1402T	KAN		CAP	VIO	example 3
<i>rrs</i> WT2	1484	<i>rrs</i> MUT2	G1484T	KAN	AMK	CAP	VIO	example 4

KAN, kanamycin; AMK, amikacin; CAP, capreomycin; VIO, viomycin

eis

The *eis* gene is examined for detection of a low-level KAN resistance.

The wild type probes comprise the most important resistance regions of the *eis* gene (see table 4). When all wild type probes stain positive, there is no detectable mutation within the examined region. In case of a mutation, the respective amplicon cannot bind to the corresponding wild type probe resulting in the absence of the wild type probe signal.

The mutation probe detects the most common resistance-mediating mutation (see table 4). More mutations within the examined *eis* gene region than those listed in table 4 are known [19]. These mutations that may be causing a failing wild type band but are not detected by the mutation probe may also cause low-level KAN resistance.

Table 4: Mutations in the *eis* promoter region and the corresponding wild type and mutation bands (according to [17,18,19,20])

Failing wild type band	Developing mutation band	Mutation	Phenotypic resistance
<i>eis</i> WT1	-	G-37T	low-level KAN
<i>eis</i> WT2	<i>eis</i> MUT1	C-14T	
	-	C-12T	
	-	G-10A	
<i>eis</i> WT3	-	C-2A	

Please note:

Only those bands whose intensities are about as strong as or stronger than that of the Amplification Control zone (AC) are to be considered. Not all bands of a strip have to show the same signal strength.

When both a mutation probe and the corresponding wild type probe of a strip are developed, this represents a valid result. Possible reasons could be:

- The tested specimen contains a heteroresistant strain.
- The tested specimen contains more than one *M. tuberculosis* complex strain (e.g. due to mixed infection of the patient).

Theoretically, a resistance can exist in spite of a wild type pattern. Possible reasons could be:

- The tested specimen contains a strain that has developed a heteroresistance and the resistance is caused by a mutation not covered by the mutation probes.
- The tested specimen contains a wild type and a resistant strain (e.g. due to mixed infection of the patient) and the resistance is caused by a mutation not covered by the mutation probes.

When a complete gene locus (all bands including the Locus Control band) is missing, this is an invalid result. If this result is generated from a clinical specimen, a possible reason could be, amongst others, that the DNA concentration in the sample is below the limit of detection.

Evaluation examples

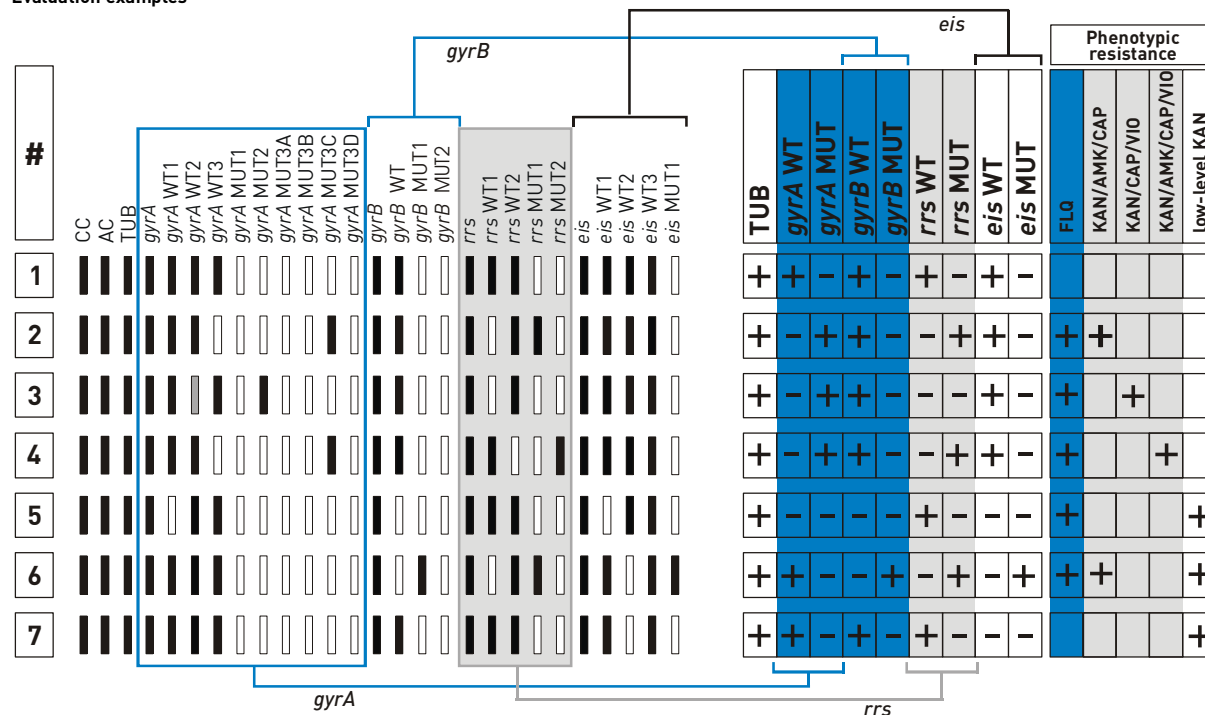


Figure 1: Examples for banding patterns and their evaluation with respect to resistances to fluoroquinolones (FLQ) and/or aminoglycosides/cyclic peptides (AG/CP)

If all wild type bands of a gene 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 as "-". In the MUT columns negative entries are only made if none of the mutation bands of the respective gene displays a coloration. If at least one of the mutation bands displays a coloration, this is classified as positive and the MUT column of the respective gene is marked with a "+". To the resistance columns a "+" is depicted only if at least one entry in the WT and MUT columns deviates from the wild type pattern of the respective gene in example 1.

Below, the examples shown above are explicated:

Example 1 shows the wild type banding pattern. All wild type probes but none of the mutation probes display a signal; hence, the evaluation chart shows "+" in the four wild type columns and "-" in the four mutation columns. Accordingly, no entry is made in the fields of the resistance columns.

Example 2: One of the *gyrA* wild type bands is missing and one of the *gyrA* mutation bands is developed. Hence, the evaluation chart shows a "-" in the "*gyrA* WT" column and a "+" in the "*gyrA* MUT" column. The *gyrB* locus displays the wild type banding pattern resulting in a wild type entry as in example 1. Due to the *gyrA* banding pattern, the strain is evaluated as FLQ-resistant. The *rrs* wild type band "*rrs* WT1" is missing, and the mutation band "*rrs* MUT1" is developed; hence, the field in the "*rrs* WT" column is marked with a "-", the field in the "*rrs* MUT" column is marked with a "+", and the strain is evaluated as cross-resistant to KAN, AMK, and CAP (see table 3 above). Finally, the probes of the *eis* locus display the wild type banding pattern; hence, the columns "*eis* WT" and "*eis* MUT" are marked according to example 1 and no low-level KAN resistance is detected.

Example 3: The "*gyrA* WT2" band is missing (signal intensity is lower than that of the AC) and the "*gyrA* MUT2" band is developed. Accordingly, the field in the "*gyrA* WT" column is marked with a "-" and the field in the "*gyrA* MUT" column is marked with a "+". The *gyrB* locus displays the wild type banding pattern which is depicted accordingly. Due to the *gyrA* result, FLQ resistance is assigned to the tested strain. The *rrs* wild type band "*rrs* WT1" is missing, but none of the *rrs* mutation bands is developed; thus, the fields in the "*rrs* WT" and "*rrs* MUT" columns are marked with a "-" and cross-resistance to KAN, CAP, and VIO is identified (see table 3 above). The *eis* locus displays the wild type banding pattern which is depicted accordingly.

Example 4: One of the *gyrA* wild type bands is missing and one of the *gyrA* mutation bands is developed. In the evaluation chart, a "-" is depicted in the field of the "*gyrA* WT" column and the field of the "*gyrA* MUT" column is marked with a "+". The *gyrB* locus displays the wild type banding pattern which is depicted accordingly. Due to the *gyrA* result, FLQ resistance is assigned to the tested strain. The *rrs* wild type band "*rrs* WT2" is missing and the mutation band "*rrs* MUT2" is developed; thus, the field in the "*rrs* WT" column is marked with a "-", the field in the "*rrs* MUT" column is marked with a "+", and the tested strain is evaluated as cross-resistant to KAN, AMK, CAP, and VIO (see table 3 above). The *eis* locus displays the wild type banding pattern which is depicted accordingly.

Example 5: From both the *gyrA* and the *gyrB* locus one wild type bands is missing and none of the *gyrA* and *gyrB* mutation bands are developed. Therefore, all *gyrA* and *gyrB* columns are marked with a “-” and FLQ resistance is assigned to the tested strain. The *rrs* locus shows the wild type banding pattern which is depicted accordingly. Finally, one of the *eis* wild type bands is missing; hence, both the fields in the “*eis* WT” and “*eis* MUT” columns are marked with a “-” and a low-level KAN resistance is detected.

Example 6 shows the wild type banding pattern for the *gyrA* locus which is depicted accordingly. The *gyrB* wild type band is missing and one of the *gyrB* mutation bands is developed. Hence, in the evaluation chart, a “-” is depicted in the field of the “*gyrB* WT” column and a “+” in the field of the “*gyrB* MUT” column. Due to the *gyrB* result, FLQ resistance is assigned to the tested strain. The *rrs* wild type band “*rrs* WT1” is missing and the mutation band “*rrs* MUT1” is developed; hence, the field in the “*rrs* WT” column is marked with a “-”, the field in the “*rrs* MUT” column is marked with a “+”, and the strain is evaluated as cross-resistant to KAN, AMK, and CAP (see table 3 above). One of the *eis* wild type bands is missing and the *eis* mutation band is developed. Hence, in the *eis* WT column, a “-” is depicted, the *eis* MUT column is marked with a “+”, and a low-level KAN resistance is assigned to the tested strain.

Example 7: Both the *gyrA* locus and the *gyrB* locus show the wild type pattern which is depicted accordingly with respect to FLQ resistance. The *rrs* locus shows the wild type pattern which is depicted accordingly. One of the *eis* wild type bands is missing. Hence, a “-” is depicted in both the “*eis* WT” and the “*eis* MUT” column of the evaluation chart, and a low-level KAN resistance is assigned to the tested strain.

Limitations

Strictly adhere to the established protocols and procedures in order to obtain correct test results and to avoid contaminations.

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

The test reflects the current state of knowledge of Hain Lifescience.

The results of this test may only be interpreted in combination with additional laboratory and clinical data available to the responsible physician. In addition, results of phenotypic drug susceptibility testing have to be considered in certain cases.

The user must have or acquire information about the local mutation distribution pattern of the genes investigated with this test. Confirmation of the test results by phenotypic drug susceptibility testing may be necessary.

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

The **GenoType MTBDRsl** test only detects those resistances that have their origins in the *gyrA*, *gyrB*, *rrs*, and *eis* gene regions examined here. Resistances originating from mutations of other genes or gene regions as well as other FLQ or AG/CP resistance mechanisms will not be detected by this test.

The test only works within the limits of the genomic regions the primers and probes were chosen from.

Please note that effects due to multiple mutations outside the investigated sequences cannot be detected by this test.

As any detection system based on hybridization, 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 subtypes might not be detected.

The members of the *M. tuberculosis* complex cannot be differentiated.

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

As any DNA detection method the test system on hand detects DNA from viable and nonviable bacteria. Therefore, the **GenoType MTBDRsl** may not be used for monitoring the progression or success of treatment of patients with antimicrobial therapy.

The **GenoType MTBDRsl** generates qualitative results. The intensities of the bands on a strip do not give information about the number of cells in a positive sample.

Performance evaluation of this assay was carried out using the **GenoLyse®** kit for DNA extraction from NALC-NaOH-decontaminated smear-positive and smear-negative sputum samples as well as from cultivated samples. Until the present edition of the instructions on hand, the performance of the test has not been validated with other DNA extraction methods or sample materials.

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.

Repeat reverse hybridization.

Weak or no signals except for Conjugate Control zone

- Quality of extracted DNA does not allow an efficient amplification. Repeat extraction.
- Amplification Mixes (AM-A and AM-B) were not mixed properly, interchanged, or added in wrong amounts. Prepare a new master mix and repeat amplification.
- Incubation temperature too high. Repeat reverse hybridization.

No homogeneous staining

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

Repeat reverse hybridization.

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.

Repeat reverse hybridization.

Unexpected result

- Wrong incubation temperature.
- Hybridization Buffer and/or Stringent Wash Solution were not properly prewarmed or mixed.
- Contamination of neighboring wells by spillage during addition of Hybridization Buffer.

Repeat reverse hybridization.

- Contamination of extracted DNA with previously extracted or amplified DNA. Repeat extraction.
- Contamination of amplification reagents. In this case, a negative control sample shows additional bands besides CC and AC. Repeat amplification using fresh reagents.
- 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. If necessary, the amount of amplicon used for reverse hybridization may be reduced down to 5 µl.
- No pure culture as starting material. Re-culture in order to exclude contamination.
- Improper sampling, storage, transport, or preparation of specimen. Request new specimen and repeat test.
- Error during DNA extraction. Repeat extraction.

Ordering Information**Order no.**

GenoType MTBDRsl VER 2.0 (kit for analysis of 12 samples)	317A
GenoType MTBDRsl VER 2.0 (kit for analysis of 96 samples)	31796A
GenoLyse® (kit for manual DNA extraction of 12 samples)	51612
GenoLyse® (kit for manual DNA extraction of 96 samples)	51610

Performance Characteristics

The performance evaluation of the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 was carried out according to the instructions for use on hand.

Diagnostic performance

1. Clinical specimens

Diagnostic performance characteristics of the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 were determined in a study with 352 sputum specimens. The study specimens were collected in a high MDR-TB burden country. Both untreated patients as well as patients with previous or current anti-TB-treatment were included in the study.

The **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 was compared to culture (successful cultivation on Loewenstein-Jensen solid medium or in MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA) and subsequent *M. tuberculosis* complex (MTBC) identification using the **GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0). For discrepant culture-negative specimens, the result of the **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 was used as reference method.

Furthermore, the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 was compared to conventional drug susceptibility testing (DST) using BACTEC MGIT 960 (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA) and Loewenstein-Jensen proportion method. Specimens with discrepant results were examined by sequencing the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 amplification region.

Additionally, all samples were examined by microscopy.

DNA extraction from NALC-NaOH-decontaminated sputum specimens was performed with the **GenoLyse**® kit according to the instructions for use.

21 specimens were excluded due to ambiguous DST results or contaminated cultures.

For the detection of MTBC, test results were rated true-positive if the result of **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 was consistent with an MTBC-positive result of culture/**GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0 or, in case of a culture-negative specimen, if a TB infection was indicated by an MTBC-positive **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 result from the respective clinical specimen.

Table 1: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 for detection of MTBC from sputum specimens compared to culture/**GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0 (GT Myco CM) or to culture/GT Myco CM and **GenoType MTBDRplus** VER 2.0 (GT MTBDRplus V2) result from the respective clinical specimens

			Culture/GT Myco CM		Sens: 98.8% Spec: 89.6% PPV: 96.9% NPV: 95.8%	Culture/GT Myco CM + GT MTBDRplus V2		Sens: 98.9% Spec: 100% PPV: 100% NPV: 95.8%
			positive	negative		positive	negative	
total	GenoType MTBDRsl VER 2.0	positive	251	8		positive	259	0
		negative	3	69		negative	3	69
			Culture/GT Myco CM		Sens: 99.6% Spec: /* PPV: 96.7% NPV: /*	Culture/GT Myco CM + GT MTBDRplus V2		Sens: 99.6% Spec: /* PPV: 100% NPV: /*
			positive	negative		positive	negative	
smear-positive	GenoType MTBDRsl VER 2.0	positive	232	8		positive	240	0
		negative	1	2		negative	1	2
			Culture/GT Myco CM		Sens: 90.5% Spec: 100% PPV: 100% NPV: 97.1%			
			positive	negative				
smear-negative	GenoType MTBDRsl VER 2.0	positive	19	0				
		negative	2	67				

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value

* no value due to low sample number

For evaluation of resistance detection, the 251 MTBC-positive samples (positive both in culture and with **GenoType MTBDRsl** VER 2.0) were used. Test results were rated true-positive if the result of **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 was consistent with the DST result or, in case of divergent results, if the result of **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 was confirmed by sequencing from culture material of the respective sample.

Table 2: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 for detection of fluoroquinolone (FLQ) resistance from sputum specimens compared to culture/DST (tested with ofloxacin) or to culture/DST and sequencing

GenoType MTBDRsl VER 2.0		Culture/DST		Sens: 93.1% Spec: 100% PPV: 100% NPV: 98.0%	Culture/DST + sequencing		Sens: 96.4% Spec: 100% PPV: 100% NPV: 99.0%
		FLQ-R	FLQ-S		FLQ-R	FLQ-S	
		FLQ-R	54	0	FLQ-R	54	0
		FLQ-S	4	193	FLQ-S	2	195

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value;

FLQ-R, fluoroquinolone-resistant; FLQ-S, fluoroquinolone-sensitive

Table 3: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 for detection of amikacin (AMK) resistance from sputum specimens compared to culture/DST or to culture/DST and sequencing

GenoType MTBDRsl VER 2.0		Culture/DST		Sens: 94.7% Spec: 98.1% PPV: 90.0% NPV: 99.1%	Culture/DST + sequencing		Sens: 97.3% Spec: 98.1% PPV: 90.0% NPV: 99.5%
		AMK-R	AMK-S		AMK-R	AMK-S	
		AMK-R	36	4	AMK-R	36	4
		AMK-S	2	209	AMK-S	1	210

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value;

AMK-R, amikacin-resistant; AM-S, amikacin-sensitive

Table 4: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 for detection of capreomycin (CAP) resistance from sputum specimens compared to culture/DST or to culture/DST and sequencing

GenoType MTBDRsl VER 2.0	Culture/DST		Sens: 90.0% Spec: 98.1% PPV: 90.0% NPV: 98.1%	Culture/DST + sequencing		Sens: 97.3% Spec: 98.1% PPV: 90.0% NPV: 99.5%
	CAP-R	CAP-S		CAP-R	CAP-S	
	CAP-R	36	4	CAP-R	36	4
	CAP-S	4	207	CAP-S	1	210

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value;
CAP-R, capreomycin-resistant; CAP-S, capreomycin-sensitive

Table 5: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 for detection of kanamycin (KAN) resistance from sputum specimens compared to culture/DST or to culture/DST and sequencing

GenoType MTBDRsl VER 2.0	Culture/DST		Sens: 94.8% Spec: 96.6% PPV: 92.4% NPV: 97.7%	Culture/DST + sequencing		Sens: 98.6% Spec: 96.6% PPV: 92.4% NPV: 99.4%
	KAN-R	KAN-S		KAN-R	KAN-S	
	KAN-R	73	6	KAN-R	73	6
	KAN-S	4	168	KAN-S	1	171

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value;
KAN-R, kanamycin-resistant; KAN-S, kanamycin-sensitive

2. Culture samples

The diagnostic performance characteristics of the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 were determined in a study with 100 MTBC-positive culture samples.

The study samples obtained from a culture collection comprised MTBC strains originating from high MDR-TB burden countries as well as from low MDR-TB burden countries.

The **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 was compared to conventional drug susceptibility testing (DST) using BACTEC MGIT 960 (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA) and Loewenstein-Jensen proportion method. Specimens with discrepant results were examined by sequencing the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 amplification region.

DNA extraction was performed using the **GenoLyse**® kit according to the instructions for use.

For kanamycin (KAN), DST was performed retrospectively using frozen culture aliquots that were recultivated. 89/100 samples yielded results; 11 samples could not be recultivated and were therefore excluded from the evaluation of KAN resistance.

Table 6: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 for detection of fluoroquinolone (FLQ) resistance from culture samples compared to culture/DST (tested with ofloxacin) or to culture/DST and sequencing

GenoType MTBDRsl VER 2.0	Culture/DST		Sens: 93.9% Spec: 98.5% PPV: 96.9% NPV: 97.1%	Culture/DST + sequencing		Sens: 100% Spec: 100% PPV: 100% NPV: 100%
	FLQ-R	FLQ-S		FLQ-R	FLQ-S	
	FLQ-R	31	1	FLQ-R	32	0
	FLQ-S	2	66	FLQ-S	0	68

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value;
FLQ-R, fluoroquinolone-resistant; FLQ-S, fluoroquinolone-sensitive

Table 7: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 for detection of amikacin (AMK) resistance from culture samples compared to culture/DST

GenoType MTBDRsl VER 2.0	Culture/DST		Sens: 100% Spec: 100% PPV: 100% NPV: 100%
	AMK-R	AMK-S	
	AMK-R	35	0
	AMK-S	0	65

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value;
AMK-R, amikacin-resistant; AM-S, amikacin-sensitive

Table 8: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 for detection of capreomycin (CAP) resistance from culture samples compared to culture/DST or to culture/DST and sequencing

GenoType MTBDRsl VER 2.0	Culture/DST		Sens: 84.6% Spec: 100% PPV: 100% NPV: 91.0%	Culture/DST + sequencing		Sens: 100% Spec: 100% PPV: 100% NPV: 100%
	CAP-R	CAP-S		CAP-R	CAP-S	
	CAP-R	33	0	CAP-R	33	0
	CAP-S	6	61	CAP-S	0	67

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value;
CAP-R, capreomycin-resistant; CAP-S, capreomycin-sensitive

Table 9: Performance characteristics of the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 for detection of kanamycin (KAN) resistance from culture samples compared to culture/DST or to culture/DST and sequencing.

GenoType MTBDRsl VER 2.0	Culture/DST		Sens: 94.4% Spec: 98.1% PPV: 97.1% NPV: 96.3%	Culture/DST + sequencing		Sens: 100% Spec: 100% PPV: 100% NPV: 100%
	KAN-R	KAN-S		KAN-R	KAN-S	
	KAN-R	34	1	KAN-R	35	0
	KAN-S	2	52	KAN-S	0	54

Sens, diagnostic sensitivity; Spec, diagnostic specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value;
KAN-R, kanamycin-resistant; KAN-S, kanamycin-sensitive

Further diagnostic performance characteristics of the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 have been published within the scope of an international multicenter study [21].

Analytical performance

Analytical specificity

The specificity of the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 is ensured by the accurate design of specific primers and probes which considers, among others, homology comparisons of the sequences published in gene databases, and by stringent reaction conditions.

The analytical specificity was determined with eight *M. tuberculosis* complex strains: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* BCG, *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae*, *M. canettii*, *M. microti*, and *M. pinnipedii* (all sensitive to fluoroquinolones (FLQ) and to aminoglycosides/cyclic peptides (AG/CP)). The following 40 strains not detectable with the test system were also analyzed: *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium spec.*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium abscessus*, *M. alvei*, *M. asiaticum*, *M. avium*, *M. celatum*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gastri*, *M. genavense*, *M. goodii*, *M. gordonae*, *M. haemophilum*, *M. immunogenum*, *M. interjectum*, *M. intermedium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum*, *M. mageritense*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. mucogenicum*, *M. peregrinum*, *M. scrofulaceum*, *M. shimoidei*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. szulgai*, *M. triplex*, *M. ulcerans*, *M. xenopi*, *Nocardia spec.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *S. pneumoniae*.

The eight *M. tuberculosis* complex isolates were correctly identified as FLQ- and AG/CP-sensitive MTBC strains. All other 40 isolates displayed invalid band patterns. Hence, an analytical specificity of 100% was achieved.

Analytical sensitivity (limit of detection, LOD)

To determine the LOD of the **GenoType MTBDRsl** for clinical samples, three BCG culture dilutions (FLQ- and AG/CP-sensitive, 1500, 150, and 15 CFU/ml) were prepared in triplicate. Including a negative control, DNA was extracted using the **GenoLyse**® kit and analyzed with the **GenoType MTBDRsl** applying the "MDR DIR" PCR protocol. An LOD of 150 CFU/ml was determined.

To determine the LOD of the **GenoType MTBDRsl** for culture samples, three BCG culture dilutions (FLQ- and AG/CP-sensitive, 1.65×10^6 , 1.65×10^5 , and 1.65×10^4 CFU/ml) were set up in triplicate. Including a negative control, DNA was extracted using the **GenoLyse**® kit and analyzed with the **GenoType MTBDRsl** applying the "MDR CUL" PCR protocol. An LOD of 1.65×10^5 CFU/ml was determined.

Reproducibility

In order to determine the intra-assay precision of the **GenoType MTBDRsl**, three BCG culture dilutions (FLQ- and AG/CP-sensitive; one above, one at, and one below the LOD) and one negative control were set up in four parallels and tested under identical conditions applying the "MDR DIR" PCR protocol. DNA extraction was performed using the **GenoLyse**® DNA extraction kit. All parallels showed identical and correct banding patterns and comparable signal strengths. Additionally, signal strengths between different sample dilutions were comparable. Hence, an intra-assay precision of 100% was achieved.

In order to determine the inter-assay precision of the **GenoType MTBDRsl**, three BCG culture dilutions (one above, one at, and one below the LOD) and a negative control were tested at three different points in time. Apart from the varied parameter, all other testing conditions were identical. DNA extraction was performed using the **GenoLyse**® DNA extraction kit and the isolates were analyzed with the **GenoType MTBDRsl** applying the "MDR DIR" PCR protocol. No deviations were detected between parallel samples, that is between runs banding patterns were identical and correct, and signal strengths were comparable. Hence, the inter-assay precision was 100%.

Interfering substances

There are substances that may inhibit PCR reactions. Such inhibitors may, for example, originate from the culture medium. In order to assess if the medium influences the **GenoType MTBDRsl**, 6 different *M. tuberculosis* complex samples (3x FLQ- and AG/CP-sensitive, 2x FLQ-sensitive and AG/CP-resistant, 1x FLQ- and AG/CP-resistant) were cultured in 4 different media (solid media: Loewenstein-Jensen, Stonebrink, and Middlebrook-7H10; liquid medium: MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)). DNA extraction was performed using the **GenoLyse**® kit. Subsequently, the culture samples were tested with the **GenoType MTBDRsl** applying the "MDR CUL" PCR protocol.

All *M. tuberculosis* complex samples showed the same correct results. Hence, it can be excluded that the tested media import inhibitors into the **GenoType MTBDRsl**.

Interfering substances may also be carried over from the sample material. Hence, the substances indicated in table 10 were tested in order to assess a potential interference with the **GenoType MTBDRsl**. Defined BCG culture dilutions above, at, and below the detection limit of clinical samples were spiked with various amounts of the potential inhibitors. From all samples, DNA extraction was performed using the **GenoLyse**® kit. Then the culture dilutions were tested with the **GenoType MTBDRsl** applying the "MDR DIR" protocol for PCR.

Table 10: Tested potential interferents of the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0

Substance/class	Description/active ingredient	Substance concentrations
Blood	Whole blood	2.5% v/v to 90% v/v
Blood	Hemoglobin	0.05% v/v to 13.5% v/v
Pus		0.5% v/v to 90% v/v

Interference of the **GenoType MTBDRsl** VER 2.0 (invalid test result) was observed in samples containing concentrations greater than 10% whole blood, 1% hemoglobin, and 2.5% pus.

Stability

Shelf life of the test kit when stored as recommended: see box label.

Stability is determined according to DIN EN ISO 23640.

References

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. WHO/HTM/TB/2015.22. World Health Organization, Geneva, Switzerland 2015.
2. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13: 1320-1330.
3. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th edition. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 2009.
4. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards), USA, Document M29 (please refer to the latest version).
5. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 1985.
6. Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA 1992.
7. Richter E, Beer J, Diel R, Hillemann D, Hoffmann H, Klotz M, Mauch H, Rüscher-Gerdes S. MiQ 5, Tuberkulose, Mykobakteriose. In: Podbielski A, Herrmann M, Kniehl E, Mauch H, Rüssmann H (eds): Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards. Elsevier, Munich, Germany 2010.
8. DIN, Deutsches Institut für Normung e.V. (ed). DIN 58943-4:2009-02: Medical microbiology - Diagnosis of tuberculosis - Part 4: Primary samples for the diagnosis of tuberculosis and mycobacteria – Qualitative and quantitative requirements, extraction, transport and storage. Beuth, Berlin, Germany 2009.
9. Cheng AF, Yew WW, Chan EW, Chin ML, Hui MM, Chan RC. Multiplex PCR amplicon conformation analysis for rapid detection of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 596-601.
10. Aubry A, Veziris N, Cambau E, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Fisher LM. Novel gyrase mutations in quinolone-resistant and -hypersusceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: functional analysis of mutant enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 104-112.
11. Matrat S, Veziris N, Mayer C, Jarlier V, Truffot-Pernot C, Camuset J, Bouvet E, Cambau E, Aubry A. Functional analysis of DNA gyrase mutant enzymes carrying mutations at position 88 in the A subunit found in clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 4170-4173.
12. Kocagöz T, Hackbarth CJ, Unsall I, Rosenberg EY, Nikaido H, Chambers HF. Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1768-1774.
13. Malik S, Willby M, Sikes D, Tsodikov OV, Posey JE. New insights into fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: functional genetic analysis of *gyrA* and *gyrB* mutations. *PLoS One* 2012; 7: e39754. doi: 10.1371/journal.pone.0039754.
14. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Teklaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998; 393: 537-44. Erratum in: *Nature* 1998; 396: 190.
15. Maus CE, Plikaytis BB, Shinnick TM. Mutation of *tlyA* confers capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 571-577.
16. Maus CE, Plikaytis BB, Shinnick TM. Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3192-3197.
17. Georgiou SB, Magana M, Garfein RS, Catanzaro DG, Catanzaro A, Rodwell TC. Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review. *PLoS One* 2012; 7: e33275. doi: 10.1371/journal.pone.0033275.
18. Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, Dalton TL, Metchock B, Starks AM, Hooks DP, Cowan LS, Plikaytis BB, Posey JE. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 2032-2041.
19. Chakravorty S, Lee JS, Cho EJ, Roh SS, Smith LE, Lee J, Kim CT, Via LE, Cho SN, Barry CE 3rd, Alland D. Genotypic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates for amikacin and kanamycin resistance by use of a rapid sloppy molecular beacon-based assay identifies more cases of low-level drug resistance than phenotypic Lowenstein-Jensen testing. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 43-51.
20. Zaunbrecher MA, Sikes RD Jr, Metchock B, Shinnick TM, Posey JE. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase *eis* confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 20004-20009.
21. Tagliani E, Cabibbe AM, Miotto P, Borroni E, Toro JC, Mansjö M, Hoffner S, Hillemann D, Zalutskaya A, Skrahina A, Cirillo DM. Diagnostic performance of the new version (v2.0) of GenoType MTBDRsl assay for detection of resistance to fluoroquinolones and second-line injectable drugs: a multicenter study. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 2961-2969.

Important Changes in IFU-317A-04

Chapter	Change
Reagents and Instruments	Three lot labels are included in the kit. New: "Conjugate Concentrate (CON-C) and Conjugate Buffer (CON-D) contain biological material. Hence, they must be considered as potentially infectious and must be handled accordingly."
Quality Control	New: "You can find the kit lot and the corresponding lots of the kit constituents on the lot labels included in the kit."
Limitations	New: "The test only works within the limits of the genomic regions the primers and probes were chosen from." New: "Please note that effects due to multiple mutations outside the investigated sequences cannot be detected by this test." New: "As any detection system based on hybridization, 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 subtypes might not be detected."



Hain Lifescience GmbH

Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany
www.hain-lifescience.de, +49 (0) 74 73- 94 51- 0

GenoType MTBDRsl

VER 2.0

P

IFU-317A-04

CE

IVD in vitro

2017-12-01



√ | אפליקציה ל-PCR

לשימוש ב-PCR ל-NALC-NaOH תרבות **GenoType MTBDRsl** (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA) (Loewenstein-Jensen, Middlebrook), אשר ניתן לשימוש גם ל-PCR. MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA) (Loewenstein-Jensen, Middlebrook), אשר ניתן לשימוש גם ל-PCR.

GenoType MTBDRsl kit (גר).
GenoType MTBDRsl test. (גר).

GenoType MTBDRsl test. (גר).
GenoType MTBDRsl test. (גר).

GenoType MTBDRsl test. (גר).
GenoType MTBDRsl test. (גר).

Σ | תהליך הבדיקה

GenoType MTBDRsl test. (גר).
GenoType MTBDRsl test. (גר).

GenoType MTBDRsl test. (גר).
GenoType MTBDRsl test. (גר).

GenoType MTBDRsl test. (גר).
GenoType MTBDRsl test. (גר).

GenoType MTBDRsl test. (גר).
GenoType MTBDRsl test. (גר).

GenoType MTBDRsl test. (גר).	GenoType MTBDRsl test. (גר).	GenoType MTBDRsl test. (גר).
15-20°C	1-2°C	1-2°C
30-35°C	20-25°C	10-15°C
2-5°C	65-70°C	
25-30°C	95-100°C	30-35°C
40-45°C	50-55°C	20-25°C
40-45°C	70-75°C	
8-10°C	70°C	1-2°C
H ₂ O	Ω, 2.2°C/μl	Ω, 2.2°C/μl

GenoType MTBDRsl test. (גר).

GenoType MTBDRsl test. (גר).

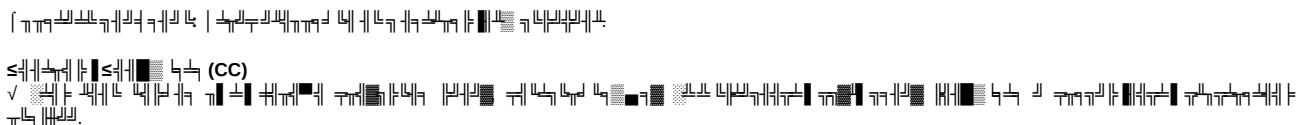
GenoType MTBDRsl test. (גר).
GenoType MTBDRsl test. (גר).

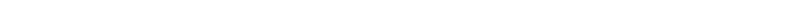
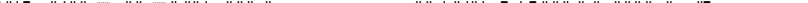
GenoType MTBDRsl test. (גר).
GenoType MTBDRsl test. (גר).

- GenoType MTBDRsl test. (גר).
- GenoType MTBDRsl test. (גר).
- GenoType MTBDRsl test. (גר).

- 



[illegible]

△  *M. tuberculosis*, 

GenoType **MTBDRs/**

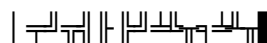
— 44 —

$\hat{\alpha} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \alpha_i$ $\hat{\beta} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \beta_i$ $\hat{\gamma} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \gamma_i$ $\hat{\delta} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i$ $\hat{\epsilon} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \epsilon_i$ $\hat{\zeta} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \zeta_i$ $\hat{\eta} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \eta_i$ $\hat{\theta} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \theta_i$ $\hat{\iota} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \iota_i$ $\hat{\kappa} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \kappa_i$ $\hat{\lambda} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \lambda_i$ $\hat{\mu} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \mu_i$ $\hat{\nu} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \nu_i$ $\hat{\xi} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \xi_i$ $\hat{\omicron} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \omicron_i$ $\hat{\pi} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \pi_i$ $\hat{\rho} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \rho_i$ $\hat{\sigma} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \sigma_i$ $\hat{\tau} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \tau_i$ $\hat{\upsilon} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \upsilon_i$ $\hat{\phi} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \phi_i$ $\hat{\chi} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \chi_i$ $\hat{\psi} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \psi_i$ $\hat{\omega} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \omega_i$ $\hat{\eta} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \eta_i$ $\hat{\theta} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \theta_i$ $\hat{\iota} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \iota_i$ $\hat{\kappa} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \kappa_i$ $\hat{\lambda} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \lambda_i$ $\hat{\mu} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \mu_i$ $\hat{\nu} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \nu_i$ $\hat{\xi} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \xi_i$ $\hat{\omicron} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \omicron_i$ $\hat{\pi} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \pi_i$ $\hat{\rho} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \rho_i$ $\hat{\sigma} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \sigma_i$ $\hat{\tau} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \tau_i$ $\hat{\upsilon} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \upsilon_i$ $\hat{\phi} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \phi_i$ $\hat{\chi} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \chi_i$ $\hat{\psi} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \psi_i$ $\hat{\omega} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \omega_i$




[illegible]

	
GenoType MTBDRsl VER 2.0 (ብገገገግ ህክምና ብዓል 12 ብገገገግ)	317A
GenoType MTBDRsl VER 2.0 (ብገገገግ ህክምና ብዓል 96 ብገገገግ)	31796A
GenoLyse® (ብገገገግ ህክምና ብዓል 12 ብገገገግ) ሆስፒታል ኢንፎርሜሽን ሲስተም	51612
GenoLyse® (ብገገገግ ህክምና ብዓል 96 ብገገገግ) ሆስፒታል ኢንፎርሜሽን ሲስተም	51610



- IFU-317A-04

14 16



317A-04-08



Hain Lifescience GmbH

Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany
www.hain-lifescience.de, +49 (0) 74 73- 94 51- 0

GenoType Mycobacterium AS

VER 1.0

Instructions for Use

IFU-298-17



IVD for in vitro diagnostic use only

GenoType Mycobacterium AS VER 1.0

Molecular Genetic Assay for Identification of Nontuberculous Mycobacteria from Cultured Material

Please read the instructions on hand completely and carefully before using the kit. Strictly adhere to the established procedure to obtain correct test results.

Intended Use

The **GenoType Mycobacterium AS** is a qualitative in vitro test for the identification of the following nontuberculous mycobacterial species from cultured material: *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*/*M. intermedium*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum*, and *M. shimoidei*.

The test is indicated as an aid for diagnosis and intended for use in medical laboratories.

Summary and Explanation

Nontuberculous mycobacteria (NTM) can cause chronic mycobacterioses. Infectiousness and symptoms vary in a broad range and depend both on the pathogen as well as on the immunocompetence of the person affected [1]. Immunocompromised persons such as HIV or leukemia patients are most likely to develop a severe mycobacteriosis. Therapy of NTM infections is exceedingly difficult because of the relative resistance of nontuberculous mycobacteria to a wide range of antibiotics [1]. Since therapeutic and treatment measures must also be specifically adjusted to the infecting species, a quick and reliable differentiation within the NTM group is indispensable.

Principles of the Procedure

The **GenoType Mycobacterium AS** test is based on the **DNA•STRIP** technology. The whole procedure is divided into three steps: (i) DNA extraction from cultured material (solid/liquid medium; the necessary reagents are not included in the kit), (ii) a multiplex amplification with biotinylated primers, and (iii) a reverse hybridization.

All reagents needed for amplification, such as polymerase and primers, are included in the Amplification Mixes A and B (AM-A and AM-B) and are optimized for this test. The membrane strips are coated with specific probes complementary to the amplified nucleic acids. After chemical denaturation, the single-stranded amplicons bind to the probes (hybridization). Highly specific binding of complementary DNA strands is ensured by stringent conditions which result from the combination of buffer composition and a certain temperature. Thus the probes reliably discriminate the different sequences of the bacterial species. The streptavidin-conjugated alkaline phosphatase binds to the amplicons' biotin via the streptavidin moiety. Finally, the alkaline phosphatase transforms an added substrate into a dye which becomes visible on the membrane strips as a colored precipitate. A template ensures the easy and fast interpretation of the banding pattern obtained.

Storage and Disposal of Kit Constituents

1/2 Kit Component 1 of 2

2/2 Kit Component 2 of 2

Store all constituents from Kit Component 1 at 2°C to 8°C. Store all constituents from Kit Component 2 at -20°C to -18°C and keep strictly separated from contaminating DNA.

Store Internal Control DNA (IC) at -20°C to -18°C in the same room where the DNA is extracted.

Store Control DNA (C+) at -20°C to -18°C in the same room where the DNA is added to the tubes containing the aliquoted master mix.

Refreeze AM-A, AM-B, IC, and C+ immediately after use.

Avoid repeated freezing and thawing of AM-A, AM-B, IC, and C+; when processing only small sample numbers per run, aliquot AM-A, AM-B, IC, and C+.

Do not use the reagents beyond their expiry date. Dispose of unused reagents and waste in accordance with federal, state, and local regulations.

Precautions for Handling Kit Constituents

Observe all federal, state, and local safety and environmental regulations. Always wear suitable protective clothing and gloves.

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

Hybridization Buffer (**HYB**) and Substrate Concentrate (**SUB-C**) are not classified as hazardous. Due to their ingredients, however, hazard statement EUH210 applies: Safety data sheet available on request.



Denaturation Solution (**DEN**) contains <2% sodium hydroxide.

Warning!

H315: Causes skin irritation. H319: Causes serious eye irritation.

P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection. P305+351+338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. P313: Get medical advice/attention.

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

Conjugate Concentrate (**CON-C**) and Conjugate Buffer (**CON-D**) contain biological material. Hence, they must be considered as potentially infectious and must be handled accordingly (e.g. see [2] or [3]).

Quality Control

In order to control the correct performance of the test and the proper functioning of kit constituents, each strip includes 3 control zones:

- a Conjugate Control zone (CC) to check the binding of the conjugate on the strip and a correct chromogenic reaction
- an Internal Control zone (IC) which documents a successful DNA extraction and amplification reaction
- a Genus Control zone (GC) which documents the presence of a member of the genus *Mycobacterium*

Observe the usual precautions for amplification setup. It is essential that all materials (such as pipette tips) coming in contact with the reagents are free from DNases. Do not interchange or pool Amplification Mixes, controls, or membrane strips from different kits unless the lots are identical (exception: an amplicon generated with the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 can directly be hybridized to **GenoType Mycobacterium AS** strips). You can find the kit lot and the corresponding lots of the kit constituents on the lot labels included in the kit.

The kit includes an Internal Control DNA (IC) which is added to each sample prior to DNA extraction. The amplicon of the Internal Control DNA binds to the Internal Control zone on the strip (see above).

A negative control sample for detection of possible contamination events should be part of each run and is included in the sample set during DNA extraction (see respective instructions for use). A valid negative control must exclusively show the CC and IC bands.

Additionally, a positive control sample containing the provided Control DNA (C+) may be included in the sample set during amplification. The Control DNA contains *M. kansasii* DNA and shows an *M. kansasii* banding pattern without IC band on the respective test strip. The amount provided is sufficient for 19 positive control samples.

IC and C+ must not be interchanged during the procedure because this may lead to erroneous results (see chapter Troubleshooting).

Specimen Requirements

Bacteria grown on solid medium or in liquid medium may be used as starting material for DNA extraction. The test must not be used for detection directly from patient specimens.

Precautions for handling specimens

Patient specimens and cultures made from patient specimens must always be considered as potentially infectious and must be handled accordingly (e.g. see [2] or [3]). Always wear suitable protective clothing and gloves. Samples from patients at risk (infected by pathogenic microorganisms including Hepatitis B and Human Immunodeficiency Virus (HIV)) and cultures made from those samples must always be labeled and handled under suitable safety conditions according to institutional guidelines.

Handling of potentially infectious specimens must be carried out in a class II safety cabinet. Potentially infectious samples must be centrifuged in a class II safety cabinet or in an aerosol-tight rotor. Open aerosol-tight rotor in safety cabinet only. For inactivated samples, a standard rotor can be used for centrifugation outside the safety cabinet.

Discard used pipette tips immediately after use in a container for biohazardous waste. After finishing the assay, discard all used disposables in a container for biohazardous waste.

Storage and transport

All specimens should be collected and transported as recommended in the CDC publication "Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory" [4], the "Clinical Microbiology Procedures Handbook" [5], or your laboratory procedure manual.

It must be ensured that until decontamination, specimens are kept in sterile plastic containers at a temperature of 2°C to 8°C. The transport of specimens at room temperature has to be carried out as soon as possible and should be done within 1-2 days [6,7]. The specimens used for decontamination must not be older than 4 days.

Preparation

Clinical specimens must be processed using the NALC/NaOH method according to the CDC publication "Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory" [4]. After decontamination, the cell pellet should be resuspended in a maximum of 1 to 1.5 ml of phosphate buffer. Cultivation can be performed either on solid medium (e.g. Loewenstein-Jensen, Middlebrook) or in liquid medium (e.g. MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)).

Handling of potentially infectious specimens must be carried out in a class II safety cabinet.

DNA Extraction

Mycobacteria grown on solid medium (e.g. Loewenstein-Jensen, Middlebrook) or in liquid medium (e.g. MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)) can be used as starting material for DNA extraction. The working area must be free from contaminating DNA.

For DNA extraction the **GenoLyse**® kit (see chapter Ordering Information) is used according to protocol C.

The method described above was used for performance evaluation of the **GenoType Mycobacterium AS** test. Until the present edition of the instructions on hand, the performance of the test has not been validated with other DNA extraction methods or sample materials.

Amplification

All reagents needed for amplification, such as polymerase and primers, are included in the Amplification Mixes A and B (AM-A and AM-B) and are optimized for this test. After thawing, spin down AM-A and AM-B briefly and mix carefully by pipetting up and down. Pipette AM-A and AM-B only in a room free from contaminating DNA. The DNA solution should be added in a separate working area.

Prepare for each sample:

- 10 µl AM-A (see Kit Component 2)
- 35 µl AM-B (see Kit Component 2)
- 5 µl DNA solution

Final volume: 50 µl

Determine the number of samples (number of samples to be analyzed plus control samples). Prepare the number of tubes needed. Prepare a master mix containing AM-A and AM-B and mix carefully but thoroughly (do not vortex). Alternatively, the content of an AM-A reaction tube may completely be transferred to an AM-B reaction tube. This will lead to master mix sufficient for 12 amplification reactions (12 tests kit) or for 4x 24 amplification reactions (96 tests kit). Please note that the master mix needs to be prepared freshly each time. Aliquot 45 µl into each of the prepared PCR tubes. In a separate working area, add 5 µl DNA solution (or C+ for a positive control) to each aliquot. Refreeze AM-A, AM-B, and C+ immediately after use.

Amplification profile:

When using a thermal cycler from Hain Lifescience with the respective preinstallation, select protocol "MDR CUL".

15 min 95°C 1 cycle

30 sec 95°C }
2 min 65°C } 10 cycles

25 sec 95°C }
40 sec 50°C }
40 sec 70°C } 20 cycles

8 min 70°C 1 cycle

Heating rate ≤ 2.2°C/sec

Amplification products can be stored at -20°C to +8°C.

Hybridization

When using a hybridization instrument from Hain Lifescience, please refer to the document "Overview equipment programs" available on www.hain-lifescience.com for the name of the hybridization protocol to be used.

The following protocol describes the manual hybridization using a water bath or a **TwinCubator**.

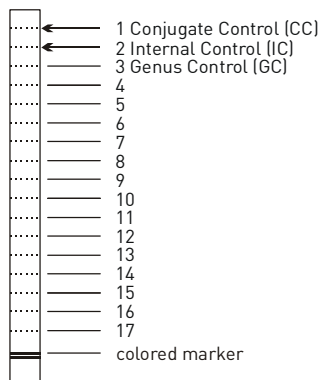
Preparation

Prewarm shaking water bath to **45°C** (the maximum tolerated deviation from the target temperature is +/-1°C) or switch on **TwinCubator**. Prewarm solutions HYB and STR to 37°C to 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 solution. 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, i.e. the time until the bands are clearly visible, 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 as soon as bands are clearly visible 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 included in the kit. When using this evaluation sheet, paste the developed strips in the designated fields by aligning the bands CC and IC with the respective lines on the sheet. Note down positive signals in the last but one column, determine species with the help of the interpretation chart and enter name of the identified species in the last column. The supplied template also serves as an aid for evaluation and must be aligned with the bands CC and IC of the strip as well. Each strip has a total of 17 reaction zones (see figure).



Note: The strip is not displayed in original size.

Conjugate Control (CC)

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

Internal Control (IC)

When the test is performed correctly, a control amplicon will bind to the Internal Control zone.

In case of a positive test result, the signal of the Internal Control zone can be weak or even vanish totally. This might be due to competition of the single reactions during amplification. In this case, the test was performed correctly and does not have to be repeated. Please note, that the positive control C+ does not show the IC band.

When only the CC and IC bands are developed, this represents a valid negative result. A missing IC band in case of a negative test result indicates mistakes during DNA extraction or during setup and/or performance of the amplification reaction, or the presence of amplification inhibitors. In this case, the test result is not valid and the test has to be repeated with the respective sample.

Genus Control (GC)

Staining of this zone documents the presence of a member of the genus *Mycobacterium*. The intensity of this band varies depending on the mycobacterial species.

When a species-specific banding pattern has developed, the GC band may be weak or even drop out completely due to competition of the single reactions during amplification. The test result, however, is to be assessed as valid.

Other bands

Specific probes, for evaluation see interpretation chart.

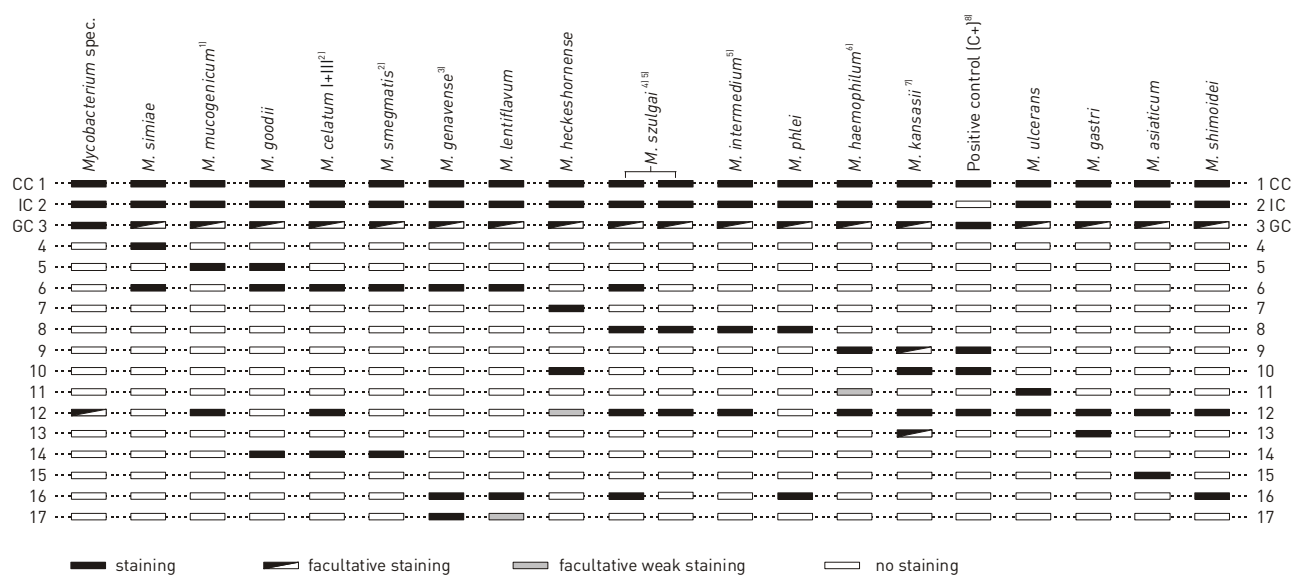
Please note:

Not all bands of a strip have to show the same signal strength. Generally, only those bands whose intensities are about as strong as or stronger than that of the Internal Control zone (IC) are to be considered (exceptions: see chapter Interpretation Chart).

An amplicon generated with the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 can directly be hybridized to **GenoType Mycobacterium AS** strips.

An amplicon generated with the **GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0 must not be hybridized to **GenoType Mycobacterium AS** strips.

Interpretation Chart



Band No. 1 (CC): Conjugate Control

Band No. 2 (IC): Internal Control

Band No. 3 (GC): Genus Control

¹⁾ For *M. mucogenicum*, the intensity of band 12 may be weaker than that of the IC band.

²⁾ When using liquid medium, contaminating bacteria may generate false-positive banding patterns for *M. celatum* or *M. smegmatis* (see chapter Performance Characteristics). The banding pattern indicating the presence of these two species is therefore only valid when the DNA was extracted from bacteria grown on solid medium (single colony/morphologically identical colonies).

³⁾ *M. triplex* shows the same banding pattern as *M. genavense*.

⁴⁾ Due to sequence variations two different *M. szulgai* banding patterns are possible.

⁵⁾ *M. szulgai* and *M. intermedium* can be differentiated using the **GenoType Mycobacterium CM** kit. *M. szulgai* will display the banding pattern 1, 2, 3, 10, and 11, *M. intermedium* will display the banding pattern 1, 2, 3, and 10.

⁶⁾ *M. nebraskense* shows the same banding pattern as *M. haemophilum*.

⁷⁾ Due to sequence variations four different *M. kansasii* banding patterns are possible.

⁸⁾ The positive control [C+] shows an *M. kansasii* banding pattern without IC band; the intensity of band 9 may be weaker than that of bands 10 and 12.

Limitations

Strictly adhere to the established protocols and procedures in order to obtain correct test results and to avoid contaminations.

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

The results of this test may only be interpreted in combination with additional laboratory and clinical data available to the responsible physician.

The test reflects the current state of knowledge of Hain Lifescience.

If more than one species is assigned to a banding pattern, these species cannot be discriminated with this test system.

In case a bacterial strain does not belong to one of the species identifiable with the **GenoType Mycobacterium AS** but is closely related to one of them, it may, in rare cases, generate the banding pattern of the closely related species detectable with the test.

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

As any detection system based on hybridization 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 subtypes might not be detected.

Performance evaluation of this assay was carried out with the **GenoLyse**® kit for DNA extraction from cultured material. Until the present edition of the instructions on hand, the performance of the test has not been validated with other DNA extraction methods or sample materials.

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.

Repeat reverse hybridization.

Weak or no signals except for Conjugate Control zone

- Quality of extracted DNA does not allow an efficient amplification. Repeat extraction.
- Amplification Mixes (AM-A and AM-B) were not mixed properly, interchanged, or added in wrong amounts. Prepare a new master mix and repeat amplification.
- Incubation temperature too high. Repeat reverse hybridization.

No homogeneous staining

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

Repeat reverse hybridization.

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.

Repeat reverse hybridization.

Unexpected result

- Wrong incubation temperature.
- Hybridization Buffer and/or Stringent Wash Solution were not properly prewarmed or mixed.
- Contamination of neighboring wells by spillage during addition of Hybridization Buffer.

Repeat reverse hybridization.

- Contamination of extracted DNA with previously extracted or amplified DNA. Repeat extraction.
- Contamination of amplification reagents. In this case, a negative control sample shows additional bands besides CC and IC. Repeat amplification using fresh reagents.
- 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. If necessary, the amount of amplicon used for reverse hybridization may be reduced down to 5 µl.
- No pure culture as starting material. Re-culture in order to exclude contamination.
- Error during DNA extraction. Repeat extraction.
- IC and C+ interchanged. In this case, the negative control and negative samples show an *M. kansasii* banding pattern without IC band and the positive control (if included) does not show the *M. kansasii* banding pattern, but only bands CC and IC. The banding pattern of positive samples is mostly not interpretable. Repeat extraction.

Materials Required but not Included in the Kit

- Absorbent paper
- Adjustable pipettes for 10, 20, 200, and 1000 µl
- Class II safety cabinet
- Disposable gloves
- Disposable sterile pipette tips with filter
- DNA extraction kit (**GenoLyse**®, see chapter Ordering Information) as well as necessary equipment
- Graduated cylinder
- PCR tubes, DNase- and RNase-free
- Reagents for cultivation of mycobacteria as well as necessary equipment
- Sample decontamination reagents as well as necessary equipment
- Shaking water bath + shaking platform **or TwinCubator** (instrument for manual hybridization) **or** automated hybridization instrument
- Thermal cycler
- Timer
- Tweezers
- Water (distilled)

Kit Contents

Order no.	298	29896
Tests	12	96
Kit Component 1 of 2 (store at 2°C to 8°C)		
Membrane strips coated with specific probes (Mycobacterium AS STRIPS)	12	2x 48
Denaturation Solution (DEN) contains <2% NaOH, dye	240 µl	2x 960 µl
Hybridization Buffer (HYB) contains <10% anionic tenside, dye	12 ml	96 ml
Stringent Wash Solution (STR) contains >25% of a quaternary ammonium compound, <1% anionic tenside, dye	12 ml	96 ml
Rinse Solution (RIN) contains buffer, <1% NaCl, <1% nonionic tenside	36 ml	3x 96 ml
Conjugate Concentrate (CON-C) contains streptavidin-conjugated alkaline phosphatase, dye	120 µl	960 µl
Conjugate Buffer (CON-D) contains buffer, 1% blocking reagent, <1% NaCl	12 ml	96 ml
Substrate Concentrate (SUB-C) contains <70% dimethyl sulfoxide, <10% 4-nitro blue tetrazolium chloride, <10% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate	120 µl	960 µl
Substrate Buffer (SUB-D) contains buffer, <1% MgCl ₂ , <1% NaCl	12 ml	96 ml
Tray, evaluation sheet	1 of each	4 of each
Instructions for use, template	1 of each	1 of each
Lot label	3	3
Kit Component 2 of 2 (store at –20°C to –18°C)		
Amplification Mix A (AM-A GT Mycobacterium AS) contains buffer, nucleotides, Taq polymerase	120 µl	4x 240 µl
Amplification Mix B (AM-B GT Mycobacterium AS) contains salts, specific primers, dye	420 µl	4x 840 µl
Internal Control DNA (IC GT Mycobacterium AS) contains bacterial DNA	192 µl	192 µl
Control DNA (C+ GT Mycobacterium AS) contains specific polynucleotides	95 µl	95 µl
Ordering Information		Order no.
GenoType Mycobacterium AS (kit for analysis of 12 samples)		298
GenoType Mycobacterium AS (kit for analysis of 96 samples)		29896
GenoLyse® (kit for manual DNA extraction of 12 samples)		51612
GenoLyse® (kit for manual DNA extraction of 96 samples)		51610

Performance Characteristics

For performance evaluation of the **GenoType Mycobacterium AS**, the test was carried out according to the instructions on hand.

Diagnostic performance

DNA extraction with quick method

The **GenoType Mycobacterium AS** (with Primer Nucleotide Mix) was tested in two studies [8,9] with a total of 319 isolates. All samples were previously characterized with at least one of the following methods: conventional biochemical and cultural methods, 16S rRNA sequence analysis of the first 500 bp of the 5' region, HPLC, INNO-LiPA Rif.TB line probe assay (Innogenetics, Gent, Belgium), AccuProbe Hybridization Protection Assays: Mycobacterium Tuberculosis Complex / Avium / Avium Complex / Intracellulare / Gordona / Kansasii Culture Identification (all Gen-Probe, San Diego, USA).

The test panel consisted of 76 strains identifiable with the **GenoType Mycobacterium AS** test kit (covering all species identifiable with the test system), 232 *Mycobacterium* strains not identifiable with the test kit, and 11 nonmycobacterial strains. In total, 304 out of 319 results were correct.

All of the 76 identifiable strains were correctly detected by the **GenoType Mycobacterium AS**.

The 232 not-identifiable strains covered 73 mycobacterial species not identifiable with the **GenoType Mycobacterium AS**. Out of these 232 strains, 217 showed the expected banding pattern (CC, UC, GC). One strain was not identified as *Mycobacterium* spec. but as one of the detectable species and was hence rated as false-positive. 14 strains were identified as gram-positive bacteria with high G+C content because of a missing GC band.

All of the 11 nonmycobacterial strains (representing 6 different nonmycobacterial species) were correctly identified as gram-positive bacteria with high G+C content.

Table 1: Sensitivity and specificity of the species-specific probes of the **GenoType Mycobacterium AS** (with Primer Nucleotide Mix, DNA extraction with quick method¹)

Species-specific probes		Methods of comparison		Total	
		Positive	Negative		
GenoType Mycobacterium AS	Positive	76	1	77	Diagnostic sensitivity: 100%
	Negative	0	242	242	Diagnostic specificity: 99.6%
	Total	76	243	319	

Table 2: Sensitivity and specificity of the genus-specific probe (GC) of the **GenoType Mycobacterium AS** (with Primer Nucleotide Mix, DNA extraction with quick method¹)

Genus-specific probe		Methods of comparison		Total	
		Positive	Negative		
GenoType Mycobacterium AS	Positive	292	0	292	Diagnostic sensitivity: 94.8%
	Negative	16	11	27	Diagnostic specificity: 100%
	Total	308	11	319	

DNA extraction with **GenoLyse**[®]

In a study comprising 52 *Mycobacterium*-positive cultures (growth on Loewenstein-Jensen medium or in MGIT [BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA]), DNA was extracted with the **GenoLyse**[®] kit and then tested with the **GenoType Mycobacterium AS** (with Primer Nucleotide Mix). For comparison, DNA was extracted with the quick method¹ in parallel and then tested with the **GenoType Mycobacterium AS** (with Primer Nucleotide Mix).

With both extraction methods, identical results were obtained (see table 3).

Table 3: Results of the *Mycobacterium* identification by **GenoType Mycobacterium AS** (with Primer Nucleotide Mix, DNA extraction with quick method¹ compared to DNA extraction with **GenoLyse**[®])

Result after DNA extraction with quick method	Number of isolates		Result after DNA extraction with GenoLyse [®]
<i>Mycobacterium</i> spec.	37	37	<i>Mycobacterium</i> spec.
<i>M. celatum</i>	2	2	<i>M. celatum</i>
High GC gram-positive bacterium	13	13	High GC gram-positive bacterium
Total	52	52	Total

The Primer Nucleotide Mix (PNM) has been replaced by new kit constituents, namely Amplification Mixes A and B (AM-A and AM-B). In order to check if the change of kit constituents impacts test results, 39 culture samples were tested with both kit variants. DNA was extracted using the **GenoLyse**[®] kit and the isolates were analyzed with the **GenoType Mycobacterium AS** applying the "MDR CUL" PCR protocol. Method of comparison was the **GenoType Mycobacterium AS** (with Primer Nucleotide Mix). For discrepant samples, the result of the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 was used as reference. The results were correct for all samples (see table 4).

Table 4: Sensitivity and specificity of the species-specific probes of the **GenoType Mycobacterium AS** (with Amplification Mixes, DNA extraction with **GenoLyse**[®])

Species-specific probes		GenoType Mycobacterium AS (with PNM) + reference method		Total	
		Positive	Negative		
GenoType Mycobacterium AS (with Amplification Mixes)	Positive	38	0	38	Diagnostic sensitivity: 100%
	Negative	0	1	1	Diagnostic specificity: 100%
	Total	38	1	39	Positive predictive value: 100%
					Negative predictive value: 100%

¹ For performance evaluation of the **GenoType Mycobacterium AS** with Primer Nucleotide Mix, a quick method was used for DNA extraction from cultured material as an alternative to the **GenoLyse**[®] kit, whereas for performance evaluation of the **GenoType Mycobacterium AS** with Amplification Mixes, solely the **GenoLyse**[®] kit was used. Until the present edition of the instructions on hand, the performance of the **GenoType Mycobacterium AS** with Amplification Mixes has not been validated with other DNA extraction methods.

Analytical performance

Analytical specificity

The specificity of the **GenoType Mycobacterium AS** test is ensured by the accurate design of specific primers and probes which considers, among others, homology comparisons of the sequences published in gene databases, and by stringent reaction conditions.

The analytical specificity of the **GenoType Mycobacterium AS** (with Primer Nucleotide Mix) was determined with strains of all identifiable *Mycobacterium* species and with strains of 73 species not detectable with the test system. Additionally, several isolates that could not yet be assigned to a certain species and 190 strains of the following non-*Mycobacterium* genera were tested: *Actinomyces*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Corynebacterium*, *Gordonia*, *Legionella*, *Nocardia*, *Nocardioideis*, *Nocardiosis*, *Rhodococcus*, *Saccharomonospora*, *Streptomyces*, *Tsukamurella*, and *Yersinia*.

One isolate from a species technically identifiable with the **GenoType Mycobacterium AS** was not detected. All other species identifiable with the assay generated a positive result. In case a bacterial strain does not belong to one of the species identifiable with the **GenoType Mycobacterium AS** but is closely related to one of them, the strain to be tested may generate the banding pattern of the closely related species detectable with the test. In the studies, this was the case with one isolate that could not be allocated to an (accepted) mycobacterial species. In one study, false-positive results for *M. celatum* or *M. smegmatis* were found in samples from liquid cultures. This phenomenon did not occur with samples from solid culture. In order to avoid this negative influence from accompanying bacterial flora the *M. celatum* and *M. smegmatis* banding patterns are only valid when the DNA was extracted from single colonies or morphologically identical colonies. This is stated accordingly in the chapter Interpretation Chart. The isolates from mycobacterial species not identifiable with the test system and the isolates from non-*Mycobacterium* species displayed no species-specific banding pattern. Hence, the analytical specificity for the species-specific bands of the **GenoType Mycobacterium AS** (with Primer Nucleotide Mix) was 99.8%.

The same samples as described above were also evaluated for performance of the Genus-specific probe (GC). An analytical specificity of 100% was determined for this probe.

The Primer Nucleotide Mix (PNM) has been replaced by new kit constituents, namely Amplification Mixes A and B (AM-A and AM-B). In order to check if the change of kit constituents impacts test results, the analytical specificity of the **GenoType Mycobacterium AS** (with Amplification Mixes) was determined with strains of all identifiable *Mycobacterium* species, i.e.: *M. asiaticum*, *M. celatum* I+III, *M. gastri*, *M. genavense*, *M. goodii*, *M. haemophilum*, *M. heckeshornense*, *M. intermedium*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum*, *M. mucogenicum*, *M. nebraskense*, *M. phlei*, *M. shimoidei*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. szulgai*, *M. triplex* and *M. ulcerans*.

Additionally, strains of the following species not detectable with the test system were analyzed:

<i>M. abscessus</i>	<i>M. canettii</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. peregrinum</i>
<i>M. africanum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. mageritense</i>	<i>M. pinnipedii</i>
<i>M. alvei</i>	<i>M. chimaera</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. scrofulaceum</i>
<i>M. avium</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. tuberculosis</i>
<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. gordonae</i>	<i>M. microti</i>	<i>M. xenopi</i>
<i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i>	<i>M. immunogenum</i>	<i>M. palustre</i>	
<i>M. bovis</i> subsp. <i>caprae</i>	<i>M. interjectum</i>	„ <i>M. paraffinicum</i> “	

Furthermore, strains of the following nonmycobacterial species were analyzed:

Bordetella pertussis, *Corynebacterium ulcerans*, *C. xerosis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Nocardia amarae*, *N. asteroides*, *N. farcinica*, *N. otidiscaviarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus erythropolis*, *R. rhodochrous*, *R. ruber*, *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae*, *Streptomyces somaliensis*, *Tsukamurella inchoensis*, *T. paurometabola*, *T. pulmonis*.

All species identifiable with this assay generated a positive result. The isolates from mycobacterial species not identifiable with this test system and the isolates from non-*Mycobacterium* species displayed no species-specific banding pattern. Hence, the analytical specificity for the species-specific bands of the **GenoType Mycobacterium AS** (with Amplification Mixes) was 100%.

The same samples as described above were also evaluated for performance of the Genus-specific probe (GC). One isolate of a mycobacterial species not identifiable with the **GenoType Mycobacterium AS** displayed no GC band. All other isolates generated a correct result. Hence, the analytical specificity for the Genus-specific probe was 98.5%.

Analytical sensitivity (limit of detection, LOD)

For determination of analytical sensitivity of the **GenoType Mycobacterium AS** (with Amplification Mixes), four BCG culture dilutions (1.65×10^6 , 1.65×10^5 , 1.65×10^4 and 1.65×10^3 CFU/ml) were set up in triplicate. Including a negative control, DNA was extracted using the **GenoLyse**® kit and analyzed with the **GenoType Mycobacterium AS** applying the “MDR CUL” PCR protocol. The limit of detection was 1.65×10^5 CFU/ml.

Reproducibility

In order to determine the intra-assay precision of the **GenoType Mycobacterium AS** (with Amplification Mixes), two BCG culture dilutions (one above and one at the cutoff concentration), one *B. pertussis* positive DNA sample and one negative control were set up in four parallels and tested under identical conditions in one PCR run. DNA was extracted using the **GenoLyse**® kit and analyzed with the **GenoType Mycobacterium AS** applying the “MDR CUL” PCR protocol. All strains showed the expected signals (*Mycobacterium* spec.) and the negative control was negative. No deviations were detected within the parallels, the banding patterns were identical and the signal strengths were comparable. Hence, the intra-assay precision was 100%.

In order to determine the inter-assay precision of the **GenoType Mycobacterium AS** (with Amplification Mixes), the same samples as described for the intra-assay precision were set up under identical conditions at three different points of time. DNA was extracted using the **GenoLyse**® kit and analyzed with the **GenoType Mycobacterium AS** applying the “MDR CUL” PCR protocol. Apart from the varied parameter, all other testing conditions were identical. All strains showed the expected signals (*Mycobacterium* spec.) and the negative control was negative. No deviations were detected within the parallels and between the runs, the banding patterns were identical and the signal strengths were comparable. Hence, the inter-assay precision was 100%.

Interfering substances

There are substances that may inhibit PCR reactions. Such inhibitors may, for example, originate from the culture medium. In order to assess if the medium influences the **GenoType Mycobacterium AS** (with Amplification Mixes), 6 different *M. tuberculosis* complex samples were cultured in 4 different media (solid media: Loewenstein-Jensen, Stonebrink, and Middlebrook-7H10, liquid medium: MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)). Then the culture samples were tested with the **GenoType Mycobacterium AS**. All samples showed correct results with all tested media. Hence, it can be excluded that the tested media import inhibitors into the **GenoType Mycobacterium AS** test (with Amplification Mixes).

Stability

Shelf life of the test kit when stored as recommended: see box label.

Stability is determined according to DIN EN ISO 23640.

References

1. Falkinham JO 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 177-215.
2. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th edition. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 2009.
3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards), USA, Document M29 (please refer to the latest version).
4. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 1985.
5. Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA 1992.
6. Richter E, Beer J, Diel R, Hillemann D, Hoffmann H, Klotz M, Mauch H, Rüsche-Gerdes S. MiQ 5, Tuberkulose, Mykobakteriose. In: Podbielski A, Herrmann M, Kniehl E, Mauch H, Rüssmann H (eds): Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards. Elsevier, Munich, Germany 2010.
7. DIN, Deutsches Institut für Normung e.V. (ed). DIN 58943-4:2009-02: Medical microbiology - Diagnosis of tuberculosis - Part 4: Primary samples for the diagnosis of tuberculosis and mycobacteria – Qualitative and quantitative requirements, extraction, transport and storage. Beuth, Berlin, Germany 2009.
8. Richter E, Rüsche-Gerdes S, Hillemann D. Evaluation of the GenoType Mycobacterium Assay for identification of mycobacterial species from cultures. *J Clin Microbiol* 2006; 44:1769-1775.
9. Russo C, Tortoli E, Menichella D. Evaluation of the new GenoType Mycobacterium assay for identification of mycobacterial species. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 334-339.

Important Changes in IFU-298-17

Chapter	Change
Precautions for Handling Kit Constituents	New: "Conjugate Concentrate (CON-C) and Conjugate Buffer (CON-D) contain biological material. Hence, they must be considered as potentially infectious and must be handled accordingly."
Quality Control	New: "Do not interchange or pool Amplification Mixes, controls, or membrane strips from different kits unless the lots are identical (exception: an amplicon generated with the GenoType Mycobacterium CM VER 2.0 can directly be hybridized to GenoType Mycobacterium AS strips). You can find the kit lot and the corresponding lots of the kit constituents on the lot labels included in the kit." New: "The amount provided is sufficient for 19 positive control samples."
Kit Contents	Three lot labels are included in the kit.

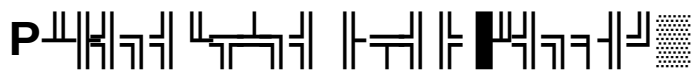


Hain Lifescience GmbH

Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany
www.hain-lifescience.de, +49 (0) 74 73- 94 51- 0

GenoType Mycobacterium AS

VER 1.0



IFU-298-17



GenoType Mycobacterium AS VER 1.0

Mycobacteria

1 7 4 3 4 3 2 1

GenoType Mycobacterium AS -  in vitro  *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*/*M. intermedium*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum*  *M. shimoidei*.

[illegible][illegible][illegible]

Genotype Mycobacterium AS DNA-STRIP

(i) ✓

(ii)

C A B (AM-A)

AM-B

1/2 $\| \cdot \|_2 \leq \| \cdot \|_1 \leq \sqrt{2} \| \cdot \|_2$

2/2

1. $\Delta T = 2^\circ\text{C}$ 8°C. 2. $\Delta T = 20^\circ\text{C}$ $\approx 18^\circ\text{C}$

[illegible]

AM-A, AM-B, IC $\neq$ C+; AM-A, AM-B, IC $\neq$ C+; AM-A, AM-B, IC $\neq$ C+; AM-A, AM-B, IC $\neq$ C+.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100. 101. 102. 103. 104. 105. 106. 107. 108. 109. 110. 111. 112. 113. 114. 115. 116. 117. 118. 119. 120. 121. 122. 123. 124. 125. 126. 127. 128. 129. 130. 131. 132. 133. 134. 135. 136. 137. 138. 139. 140. 141. 142. 143. 144. 145. 146. 147. 148. 149. 150. 151. 152. 153. 154. 155. 156. 157. 158. 159. 160. 161. 162. 163. 164. 165. 166. 167. 168. 169. 170. 171. 172. 173. 174. 175. 176. 177. 178. 179. 180. 181. 182. 183. 184. 185. 186. 187. 188. 189. 190. 191. 192. 193. 194. 195. 196. 197. 198. 199. 200. 201. 202. 203. 204. 205. 206. 207. 208. 209. 210. 211. 212. 213. 214. 215. 216. 217. 218. 219. 220. 221. 222. 223. 224. 225. 226. 227. 228. 229. 230. 231. 232. 233. 234. 235. 236. 237. 238. 239. 240. 241. 242. 243. 244. 245. 246. 247. 248. 249. 250. 251. 252. 253. 254. 255. 256. 257. 258. 259. 260. 261. 262. 263. 264. 265. 266. 267. 268. 269. 270. 271. 272. 273. 274. 275. 276. 277. 278. 279. 280. 281. 282. 283. 284. 285. 286. 287. 288. 289. 290. 291. 292. 293. 294. 295. 296. 297. 298. 299. 300. 301. 302. 303. 304. 305. 306. 307. 308. 309. 310. 311. 312. 313. 314. 315. 316. 317. 318. 319. 320. 321. 322. 323. 324. 325. 326. 327. 328. 329. 330. 331. 332. 333. 334. 335. 336. 337. 338. 339. 340. 341. 342. 343. 344. 345. 346. 347. 348. 349. 350. 351. 352. 353. 354. 355. 356. 357. 358. 359. 360. 361. 362. 363. 364. 365. 366. 367. 368. 369. 370. 371. 372. 373. 374. 375. 376. 377. 378. 379. 380. 381. 382. 383. 384. 385. 386. 387. 388. 389. 390. 391. 392. 393. 394. 395. 396. 397. 398. 399. 400. 401. 402. 403. 404. 405. 406. 407. 408. 409. 410. 411. 412. 413. 414. 415. 416. 417. 418. 419. 420. 421. 422. 423. 424. 425. 426. 427. 428. 429. 430. 431. 432. 433. 434. 435. 436. 437. 438. 439. 440. 441. 442. 443. 444. 445. 446. 447. 448. 449. 450. 451. 452. 453. 454. 455. 456. 457. 458. 459. 460. 461. 462. 463. 464. 465. 466. 467. 468. 469. 470. 471. 472. 473. 474. 475. 476. 477. 478. 479. 480. 481. 482. 483. 484. 485. 486. 487. 488. 489. 490. 491. 492. 493. 494. 495. 496. 497. 498. 499. 500. 501. 502. 503. 504. 505. 506. 507. 508. 509. 510. 511. 512. 513. 514. 515. 516. 517. 518. 519. 520. 521. 522. 523. 524. 525. 526. 527. 528. 529. 530. 531. 532. 533. 534. 535. 536. 537. 538. 539. 540. 541. 542. 543. 544. 545. 546. 547. 548. 549. 550. 551. 552. 553. 554. 555. 556. 557. 558. 559. 560. 561. 562. 563. 564. 565. 566. 567. 568. 569. 570. 571. 572. 573. 574. 575. 576. 577. 578. 579. 580. 581. 582. 583. 584. 585. 586. 587. 588. 589. 590. 591. 592. 593. 594. 595. 596. 597. 598. 599. 600. 601. 602. 603. 604. 605. 606. 607. 608. 609. 610. 611. 612. 613. 614. 615. 616. 617. 618. 619. 620. 621. 622. 623. 624. 625. 626. 627. 628. 629. 630. 631. 632. 633. 634. 635. 636. 637. 638. 639. 640. 641. 642. 643. 644. 645. 646. 647. 648. 649. 650. 651. 652. 653. 654. 655. 656. 657. 658. 659. 660. 661. 662. 663. 664. 665. 666. 667. 668. 669. 670. 671. 672. 673. 674. 675. 676. 677. 678. 679. 680. 681. 682. 683. 684. 685. 686. 687. 688. 689. 690. 691. 692. 693. 694. 695. 696. 697. 698. 699. 700. 701. 702. 703. 704. 705. 706. 707. 708. 709. 710. 711. 712. 713. 714. 715. 716. 717. 718. 719. 720. 721. 722. 723. 724. 725. 726. 727. 728. 729. 730. 731. 732. 733. 734. 735. 736. 737. 738. 739. 740. 741. 742. 743. 744. 745. 746. 747. 748. 749. 750. 751. 752. 753. 754. 755. 756. 757. 758. 759. 760. 761. 762. 763. 764. 765. 766. 767. 768. 769. 770. 771. 772. 773. 774. 775. 776. 777. 778. 779. 780. 781. 782. 783. 784. 785. 786. 787. 788. 789. 790. 791. 792. 793. 794. 795. 796. 797. 798. 799. 800. 801. 802. 803. 804. 805. 806. 807. 808. 809. 810. 811. 812. 813. 814. 815. 816. 817. 818. 819. 820. 821. 822. 823. 824. 825. 826. 827. 828. 829. 830. 831. 832. 833. 834. 835. 836. 837. 838. 839. 840.

[illegible][illegible]

$\sqrt{-9 \frac{1}{2} T L}$ (DEN) $< 2\%$

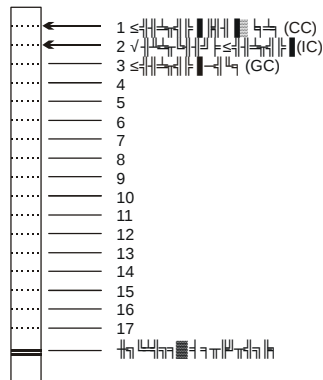
$\int \frac{1}{x^2} dx = -\frac{1}{x} + C$

H315: √

P280:  P305+351+338: 
 $\geq \Sigma = \Sigma$:  P313: 

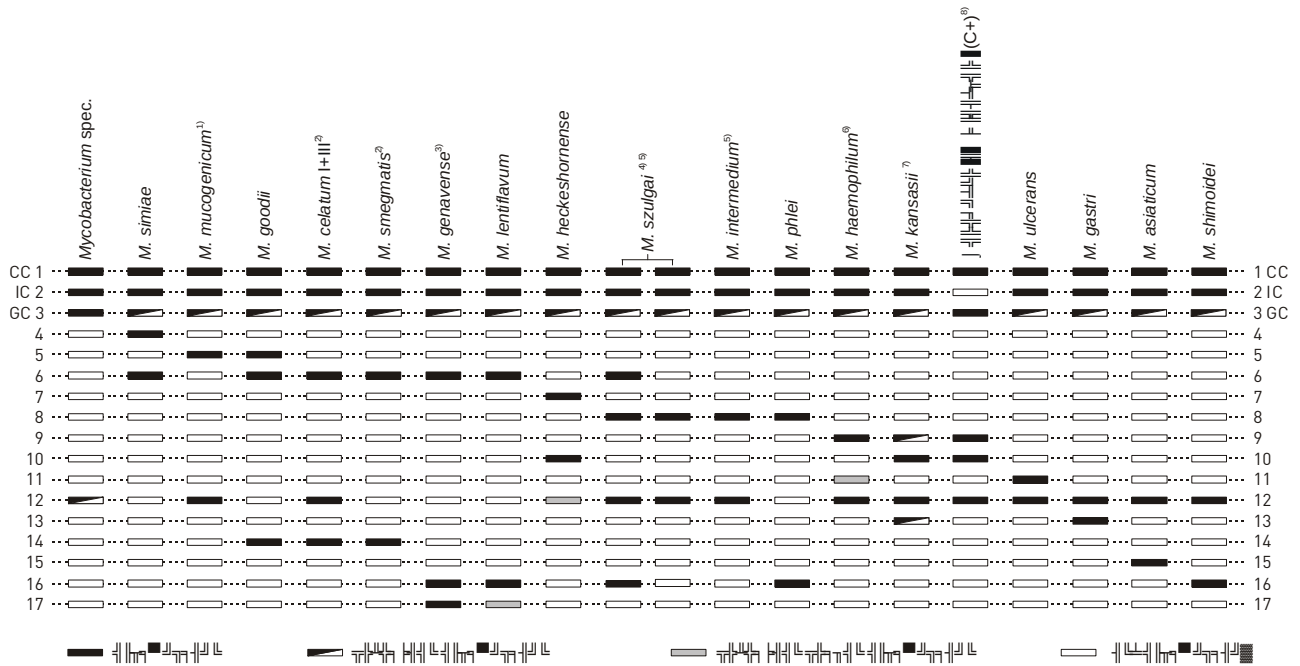
www.hain-lifescience.com/products/msds.html

 (CON-C)
 (CON-D)
 (CON-E)



GenoType Mycobacterium CM VER 2.0

GenoType Mycobacterium CM



GenoType Mycobacterium CM gel image showing 17 lanes. Lanes 1-17 are labeled with Mycobacterium species: Mycobacterium spec., M. simiae, M. mucogenicum¹, M. goodii, M. celatum I+III², M. smegmatis³, M. genavense³, M. lentiflavum, M. heckeshornense, M. szulgai⁴⁵, M. intermedium⁶, M. phlei, M. haemophilum⁸, M. kansasii⁷, M. ulcerans, M. gastri, M. asiaticum, and M. shimoidei. The gel shows bands for each species across 17 lanes. A legend at the bottom indicates band patterns for different species groups.

- 1) M. mucogenicum 12 = IC.
- 2) M. smegmatis 11, 12 = IC. M. celatum 12 = IC.
- 3) M. triplex 11, 12 = IC. M. genavense 11, 12 = IC.
- 4) M. szulgai 11, 12 = IC. M. intermedium 11, 12 = IC.
- 5) M. szulgai 11, 12 = IC. M. intermedium 11, 12 = IC.
- 6) M. nebraskense 11, 12 = IC. M. haemophilum 11, 12 = IC.
- 7) M. kansasii 11, 12 = IC.
- 8) M. kansasii 11, 12 = IC.

GenoType Mycobacterium CM gel image showing 17 lanes. Lanes 1-17 are labeled with Mycobacterium species: Mycobacterium spec., M. simiae, M. mucogenicum¹, M. goodii, M. celatum I+III², M. smegmatis³, M. genavense³, M. lentiflavum, M. heckeshornense, M. szulgai⁴⁵, M. intermedium⁶, M. phlei, M. haemophilum⁸, M. kansasii⁷, M. ulcerans, M. gastri, M. asiaticum, and M. shimoidei. The gel shows bands for each species across 17 lanes. A legend at the bottom indicates band patterns for different species groups.

GenoType Mycobacterium AS gel image showing 17 lanes. Lanes 1-17 are labeled with Mycobacterium species: Mycobacterium spec., M. simiae, M. mucogenicum¹, M. goodii, M. celatum I+III², M. smegmatis³, M. genavense³, M. lentiflavum, M. heckeshornense, M. szulgai⁴⁵, M. intermedium⁶, M. phlei, M. haemophilum⁸, M. kansasii⁷, M. ulcerans, M. gastri, M. asiaticum, and M. shimoidei. The gel shows bands for each species across 17 lanes. A legend at the bottom indicates band patterns for different species groups.

GenoType Mycobacterium AS gel image showing 17 lanes. Lanes 1-17 are labeled with Mycobacterium species: Mycobacterium spec., M. simiae, M. mucogenicum¹, M. goodii, M. celatum I+III², M. smegmatis³, M. genavense³, M. lentiflavum, M. heckeshornense, M. szulgai⁴⁵, M. intermedium⁶, M. phlei, M. haemophilum⁸, M. kansasii⁷, M. ulcerans, M. gastri, M. asiaticum, and M. shimoidei. The gel shows bands for each species across 17 lanes. A legend at the bottom indicates band patterns for different species groups.

GenoType Mycobacterium AS gel image showing 17 lanes. Lanes 1-17 are labeled with Mycobacterium species: Mycobacterium spec., M. simiae, M. mucogenicum¹, M. goodii, M. celatum I+III², M. smegmatis³, M. genavense³, M. lentiflavum, M. heckeshornense, M. szulgai⁴⁵, M. intermedium⁶, M. phlei, M. haemophilum⁸, M. kansasii⁷, M. ulcerans, M. gastri, M. asiaticum, and M. shimoidei. The gel shows bands for each species across 17 lanes. A legend at the bottom indicates band patterns for different species groups.

— 44 —

[illegible]

וְהָיָה כִּי יִשְׁמַע ה' אֶת הַקּוֹל וְהָיָה אֲנִי וְהָיָה
 וְהָיָה כִּי יִשְׁמַע ה' אֶת הַקּוֹל וְהָיָה אֲנִי וְהָיָה

[illegible]

— 4 —

1. $10, 20, 200$ μ 1000 μ
 2. $2-4$
 3. $10-20$
 4. $10-20$
 5. $10-20$
 6. $10-20$
 7. $10-20$
 8. $10-20$
 9. $10-20$
 10. $10-20$
 11. $10-20$
 12. $10-20$
 13. $10-20$
 14. $10-20$
 15. $10-20$
 16. $10-20$
 17. $10-20$
 18. $10-20$
 19. $10-20$
 20. $10-20$
 21. $10-20$
 22. $10-20$
 23. $10-20$
 24. $10-20$
 25. $10-20$
 26. $10-20$
 27. $10-20$
 28. $10-20$
 29. $10-20$
 30. $10-20$
 31. $10-20$
 32. $10-20$
 33. $10-20$
 34. $10-20$
 35. $10-20$
 36. $10-20$
 37. $10-20$
 38. $10-20$
 39. $10-20$
 40. $10-20$
 41. $10-20$
 42. $10-20$
 43. $10-20$
 44. $10-20$
 45. $10-20$
 46. $10-20$
 47. $10-20$
 48. $10-20$
 49. $10-20$
 50. $10-20$
 51. $10-20$
 52. $10-20$
 53. $10-20$
 54. $10-20$
 55. $10-20$
 56. $10-20$
 57. $10-20$
 58. $10-20$
 59. $10-20$
 60. $10-20$
 61. $10-20$
 62. $10-20$
 63. $10-20$
 64. $10-20$
 65. $10-20$
 66. $10-20$
 67. $10-20$
 68. $10-20$
 69. $10-20$
 70. $10-20$
 71. $10-20$
 72. $10-20$
 73. $10-20$
 74. $10-20$
 75. $10-20$
 76. $10-20$
 77. $10-20$
 78. $10-20$
 79. $10-20$
 80. $10-20$
 81. $10-20$
 82. $10-20$
 83. $10-20$
 84. $10-20$
 85. $10-20$
 86. $10-20$
 87. $10-20$
 88. $10-20$
 89. $10-20$
 90. $10-20$
 91. $10-20$
 92. $10-20$
 93. $10-20$
 94. $10-20$
 95. $10-20$
 96. $10-20$
 97. $10-20$
 98. $10-20$
 99. $10-20$
 100. $10-20$

[illegible]

GenoType Mycobacterium AS

$\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{1}{\sigma_i^2} \right)^2}$

GenoType Mycobacterium AS 
319 
(Innogenetics, Gent, Belgium),  $\leq$ 16S rRNA  $\pm$ 500 bp  50  $\sqrt{f}$  , INNO-LiPA Rif.TB 
                 

GenoType Mycobacterium AS

GenoType Mycobacterium AS.

GenoType Mycobacterium AS (97%)

| | GenoType | Mycobacterium | AS | 76 | 1 | 77 | | 100% |
|--|----------|---------------|----|----|-----|-----|--|-------|
| | | | | 0 | 242 | 242 | | 99,6% |
| | | | | 76 | 243 | 319 | | |

2: (GC) GenoType Mycobacterium AS

| | 292 | 0 | 292 |
|----------------------------------|-----|----|-----|
| GenoType Mycobacterium AS | 292 | 0 | 292 |
| | 16 | 11 | 27 |
| | 308 | 11 | 319 |

✓ 52 *Mycobacterium* (התוצאה של Loewenstein-Jensen MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)), **GenoLyse®** **GenoType Mycobacterium AS** (התוצאה של

3: **GenoType Mycobacterium AS** (/-) **GenoLyse®**

| GenoLyse® | | GenoLyse® | |
|---|----------------------------|---|----------------------------|
|  | <i>Mycobacterium</i> spec. |  | <i>Mycobacterium</i> spec. |
|  | <i>M. celatum</i> |  | <i>M. celatum</i> |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |
|  | GC |  | GC |

GenoType Mycobacterium AS (GenoType Mycobacterium AS, version 2.0.1) (4). The results of the GenoType Mycobacterium AS and GenoType Mycobacterium CM VER 2.0.1 (4) are shown in Table 1. The results of the GenoType Mycobacterium AS and GenoType Mycobacterium CM VER 2.0.1 are shown in Table 1. The results of the GenoType Mycobacterium AS and GenoType Mycobacterium CM VER 2.0.1 are shown in Table 1.

4: **GenoType Mycobacterium AS** (Σ) **GenoLyse®)**

| GenoType Mycobacterium AS (c | | PNM) | | GenoType Mycobacterium AS (c | | PNM) | |
|------------------------------|----|------|----|------------------------------|------|------|------|
| √ | U | U | U | U | U | U | U |
| GenoType Mycobacterium AS | 38 | 0 | 38 | 100% | 100% | 100% | 100% |
| (38) | 0 | 1 | 1 | 100% | 100% | 100% | 100% |
| √ | U | U | U | U | U | U | U |
| GenoType Mycobacterium AS | 38 | 1 | 39 | 100% | 100% | 100% | 100% |
| (38) | 0 | 1 | 39 | 100% | 100% | 100% | 100% |

1) 

GenoType Mycobacterium AS

GenoType Mycobacterium AS

GenoType Mycobacterium AS

GenoType Mycobacterium AS

GenoType Mycobacterium AS

| | | | |
|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|
| <i>M. abscessus</i> | <i>M. canettii</i> | <i>M. intracellulare</i> | <i>M. peregrinus</i> |
| <i>M. africanum</i> | <i>M. chelonae</i> | <i>M. mageritense</i> | <i>M. pinnipedii</i> |
| <i>M. alvei</i> | <i>M. chimaera</i> | <i>M. malmoense</i> | <i>M. scrofulaceum</i> |
| <i>M. avium</i> | <i>M. fortuitum</i> | <i>M. marinum</i> | <i>M. tuberculosis</i> |
| <i>M. bovis BCG</i> | <i>M. gordonae</i> | <i>M. microti</i> | <i>M. xenopi</i> |
| <i>M. bovis subsp. bovis</i> | <i>M. immunogenum</i> | <i>M. palustre</i> | |
| <i>M. bovis subsp. caprae</i> | <i>M. interjectum</i> | <i>M. paraffinicum</i> | |

GenoType Mycobacterium AS

GenoType Mycobacterium AS

GenoType Mycobacterium AS

GenoType Mycobacterium AS

GenoType Mycobacterium AS



Hain Lifescience GmbH

Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany
www.hain-lifescience.de, +49 (0) 74 73- 94 51- 0

GenoType Mycobacterium CM

VER 2.0

Instructions for Use

IFU-299A-03



IVD for in vitro diagnostic use only

2021-08-09



GenoType Mycobacterium CM VER 2.0

Molecular Genetic Assay for Identification of Clinically Relevant Mycobacterial Species from Cultured Material

Please read the instructions on hand completely and carefully before using the kit. Strictly adhere to the established procedure to obtain correct test results.

Intended Use

The **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 is a qualitative in vitro test for the identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex as well as the following nontuberculous mycobacteria from cultured material: *M. avium*, *M. chelonae*, *M. abscessus* complex, *M. fortuitum* group, *M. goodii*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, and *M. xenopi*.

The test is indicated as an aid for diagnosis and intended for use in medical laboratories.

Summary and Explanation

Mycobacterioses are infectious diseases caused by bacteria of the genus *Mycobacterium*. The most significant is tuberculosis (TB) caused by the members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. In 2019, there were an estimated 10 million incident cases of TB globally, and an estimated 1.4 million TB deaths [1].

The TB pathogens are immobile, obligate aerobic, acid-fast bacilli belonging to the family of *Mycobacteriaceae*. They are gram-positive with a high genomic G+C content (59–66%). The genus *Mycobacterium* comprises numerous species which are divided into three groups: (i) the *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. canettii*, and *M. pinnipedii*), (ii) *M. leprae* causing leprosy, and (iii) atypical or nontuberculous mycobacteria (NTM). In view of the varying pathogenicity and apathogenicity of some species, a fast and certain identification of the *M. tuberculosis* complex and hence its differentiation from the NTM is most essential.

NTM can cause chronic mycobacterioses. Infectiousness and symptoms vary in a broad range and depend both on the pathogen as well as on the immunocompetence of the person affected [2]. Immunocompromised persons such as HIV or leukemia patients are most likely to develop a severe mycobacteriosis.

The **GenoType Mycobacterium CM** permits the rapid and reliable differentiation of relevant mycobacteria and therefore the fast application of specific treatment and preventive measures. If it was not possible to identify a single species with this test, a specification may be achieved using the **GenoType Mycobacterium AS** kit (see Interpretation Chart).

Principles of the Procedure

The **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 is based on the **DNA•STRIP** technology. The whole procedure is divided into three steps: (i) DNA extraction from cultured material (solid/liquid medium; the necessary reagents are not included in the kit), (ii) a multiplex amplification with biotinylated primers, and (iii) a reverse hybridization.

All reagents needed for amplification, such as polymerase and primers, are included in the Amplification Mixes A and B (AM-A and AM-B) and are optimized for this test. The membrane strips are coated with specific probes complementary to the amplified nucleic acids. After chemical denaturation, the single-stranded amplicons bind to the probes (hybridization). Highly specific binding of complementary DNA strands is ensured by stringent conditions which result from the combination of buffer composition and a certain temperature. Thus, the probes reliably discriminate the different sequences of the bacterial species. The streptavidin-conjugated alkaline phosphatase binds to the amplicons' biotin via the streptavidin moiety. Finally, the alkaline phosphatase transforms an added substrate into a dye which becomes visible on the membrane strips as a colored precipitate. A template ensures the easy and fast interpretation of the banding pattern obtained.

Reagents and Instruments

Kit Contents

| Order no. | 299A | 29996A |
|---|-----------|-----------|
| Tests | 12 | 96 |
| Kit Component 1 of 2 (store at 2°C to 8°C) | | |
| Membrane strips coated with specific probes
(Mycobacterium CM VER 2.0 STRIPS) | 12 | 2x 48 |
| Denaturation Solution (DEN)
contains <2% NaOH, dye | 240 µl | 2x 960 µl |
| Hybridization Buffer (HYB)
contains <10% anionic tenside, dye | 12 ml | 96 ml |
| Stringent Wash Solution (STR)
contains >25% of a quaternary ammonium compound, <1% anionic tenside, dye | 12 ml | 96 ml |
| Rinse Solution (RIN)
contains buffer, <1% NaCl, <1% nonionic tenside | 36 ml | 3x 96 ml |
| Conjugate Concentrate (CON-C)
contains streptavidin-conjugated alkaline phosphatase, dye | 120 µl | 960 µl |
| Conjugate Buffer (CON-D)
contains buffer, 1% blocking reagent, <1% NaCl | 12 ml | 96 ml |
| Substrate Concentrate (SUB-C)
contains <70% dimethyl sulfoxide, <10% 4-nitro blue tetrazolium chloride,
<10% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate | 120 µl | 960 µl |
| Substrate Buffer (SUB-D)
contains buffer, <1% MgCl ₂ , <1% NaCl | 12 ml | 96 ml |
| Tray, evaluation sheet | 1 of each | 4 of each |
| Instructions for use, template | 1 of each | 1 of each |
| Lot label | 3 | 3 |

Kit Component 2 of 2 [store at –20°C to –18°C]

| | | |
|--|--------|-----------|
| Amplification Mix A (AM-A GT Mycobacterium CM VER 2.0)
contains buffer, nucleotides, Taq polymerase | 120 µl | 4x 240 µl |
| Amplification Mix B (AM-B GT Mycobacterium CM VER 2.0)
contains salts, specific primers, dye | 420 µl | 4x 840 µl |
| Internal Control DNA (IC GT Mycobacterium CM VER 2.0)
contains bacterial DNA | 192 µl | 192 µl |
| Control DNA (C+ GT Mycobacterium CM VER 2.0)
contains specific polynucleotides | 95 µl | 95 µl |

Storage and Disposal of Kit Constituents

1/2 Kit Component 1 of 2

2/2 Kit Component 2 of 2

Store all constituents from Kit Component 1 at 2°C to 8°C. Store all constituents from Kit Component 2 at –20°C to –18°C and keep strictly separated from contaminating DNA.

Store Internal Control DNA (IC) at –20°C to –18°C in the same room where the DNA is extracted.

Store Control DNA (C+) at –20°C to –18°C in the same room where the DNA is added to the tubes containing the aliquoted master mix.

Refreeze AM-A, AM-B, IC, and C+ immediately after use.

Avoid repeated freezing and thawing (>4x) of AM-A, AM-B, IC, and C+; when processing only small sample numbers per run, aliquot AM-A, AM-B, IC, and C+.

Do not use the reagents beyond their expiry date. Dispose of unused reagents and waste in accordance with federal, state, and local regulations.

Precautions for Handling Kit Constituents

Observe all federal, state, and local safety and environmental regulations. Always wear suitable protective clothing, protective gloves, and eye protection.

For additional information on the hazardous substances included in the kit, please refer to the safety data sheets which can be downloaded from:
www.hain-lifescience.com/products/msds.html

Conjugate Concentrate (**CON-C**) and Conjugate Buffer (**CON-D**) contain biological material. Hence, they must be considered as potentially infectious and must be handled accordingly (e.g. see [3] or [4]).

Material Required but not Included in the Kit

- Absorbent paper
- Adjustable pipettes for 10, 20, 200, and 1000 µl
- Disposable gloves
- Disposable sterile pipette tips with filter
- DNA extraction kit (**GenoLyse**®, see chapter Ordering Information) as well as necessary equipment
- Graduated cylinder
- PCR tubes, DNase- and RNase-free
- Reagents for cultivation of mycobacteria as well as necessary equipment
- Sample decontamination reagents as well as necessary equipment
- Shaking water bath + shaking platform **or** **TwinCubator** (instrument for manual hybridization) **or** automated hybridization instrument
- Thermal cycler
- Timer
- Tweezers
- Water (distilled)

Quality Control

In order to control the correct performance of the test and the proper functioning of kit constituents, each strip includes 3 control zones:

- a Conjugate Control zone (CC) to check the binding of the conjugate on the strip and a correct chromogenic reaction
- an Internal Control zone (IC) which documents a successful DNA extraction and amplification reaction
- a Genus Control zone (GC) which documents the presence of a member of the genus *Mycobacterium*

Observe the usual precautions for amplification setup. It is essential that all materials (such as pipette tips) coming in contact with the reagents are free from DNases. Do not interchange or pool Amplification Mixes, controls, or membrane strips from different kits unless the lots are identical (exception: an amplicon generated with the **GenoType Mycobacterium CM VER 2.0** can directly be hybridized to **GenoType Mycobacterium AS** strips). You can find the kit lot and the corresponding lots of the kit constituents on the lot labels included in the kit.

The kit includes an Internal Control DNA (IC) which is added to each sample during DNA extraction. The amplicon of the Internal Control DNA binds to the Internal Control zone on the strip (see above).

A negative control sample for detection of possible contamination events should be part of each run and is included during DNA extraction. A valid negative control must exclusively show the CC and IC bands.

Additionally, a positive control sample containing the provided Control DNA (C+) may be included. The Control DNA contains *M. kansasii* DNA and shows an *M. kansasii* banding pattern without IC band on the respective test strip. The amount provided is sufficient for 19 positive control samples.

IC and C+ must not be interchanged during the procedure because this may lead to erroneous results (see chapter Troubleshooting).

Sample Requirements

Mycobacteria grown on solid medium (e.g. Loewenstein-Jensen, Middlebrook) or in liquid medium (e.g. MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)) are used as starting material for DNA extraction. The test must not be used for detection directly from patient specimens.

Precautions for handling samples

Culture samples made from patient specimens must always be considered as infectious and must be handled accordingly (e.g. see [3] or [4]). Always wear suitable protective clothing and gloves. Samples from patients at risk (infected by pathogenic microorganisms or viruses including Hepatitis B and Human Immunodeficiency Virus (HIV)) and cultures made from those samples must always be labeled and handled under suitable safety conditions according to institutional guidelines.

All culture samples that may contain mycobacteria should be handled applying Biosafety Level 2 practices or, when indicated, Biosafety Level 3 practices (e.g. see [3]). Observe all federal, state, and local safety regulations.

Discard used pipette tips immediately after use in a container for biohazardous waste. After finishing the assay, discard all used disposables in a container for biohazardous waste.

Storage, transport and preparation

Transport, storage and preparation of patient specimens and culture samples should be carried out according to local, national and/or international guidelines and standards of the laboratory.

DNA Extraction

Mycobacteria grown on solid medium (e.g. Loewenstein-Jensen, Middlebrook) or in liquid medium (e.g. MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)) are used as starting material for DNA extraction. The working area must be free from contaminating DNA.

For DNA extraction the **GenoLyse®** kit (see chapter Ordering Information) is used.

The method described above was used for performance evaluation of the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0. The performance of the test has not been validated with other DNA extraction methods or sample materials.

Amplification

All reagents needed for amplification such as polymerase and primers are included in the Amplification Mixes A and B (AM-A and AM-B) and are optimized for this test. Thaw AM-A and AM-B shortly before preparing the master mix, spin down briefly and mix carefully by pipetting up and down. Pipette AM-A and AM-B only in a room free from contaminating DNA. To avoid contamination, the DNA solution must be added in a separate working area.

Prepare for each sample:

- 10 µl AM-A (see Kit Component 2)
- 35 µl AM-B (see Kit Component 2)
- 5 µl DNA solution

Final volume: 50 µl

Determine the total number of samples (number of samples to be analyzed plus control samples). Prepare the number of tubes needed. Prepare a master mix containing AM-A and AM-B and mix carefully but thoroughly (do not vortex). Alternatively, the content of an AM-A reaction tube may completely be transferred to an AM-B reaction tube. This will lead to master mix sufficient for 12 amplification reactions (12 tests kit) or for 4x 24 amplification reactions (96 tests kit). Please note that the master mix needs to be prepared freshly each time and needs to be processed quickly. Aliquot 45 µl into each of the prepared PCR tubes. In a separate working area, add 5 µl DNA solution (or C+ for a positive control) to each aliquot. Refreeze AM-A, AM-B, and C+ immediately after use.

Amplification profile:

When using a thermal cycler from Hain Lifescience with the respective preinstallation, select protocol "MDR CUL".

| | | |
|--------------|------------|-----------|
| 15 min | 95°C | 1 cycle |
| 30 sec | 95°C | 10 cycles |
| 2 min | 65°C | |
| 25 sec | 95°C | 20 cycles |
| 40 sec | 50°C | |
| 40 sec | 70°C | |
| 8 min | 70°C | 1 cycle |
| Heating rate | ≤2.2°C/sec | |

Amplification products can be stored at –20°C to +8°C.

Hybridization

When using a hybridization instrument from Hain Lifescience, please refer to the document "Overview equipment programs" available on www.hain-lifescience.com for the name of the hybridization protocol to be used.

The following protocol describes the manual hybridization using a water bath or a **TwinCubator**.

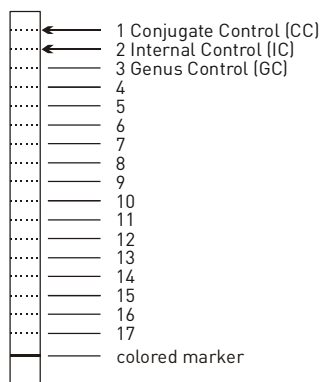
Preparation

Prewarm shaking water bath to **45°C** (the maximum tolerated deviation from the target temperature is $\pm 1^{\circ}\text{C}$) or switch on **TwinCubator**. Prewarm solutions HYB and STR to 37°C to 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 solution. 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, i.e. the time until the bands are clearly visible, 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 as soon as bands are clearly visible 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 included in the kit. When using this evaluation sheet, paste the developed strips in the designated fields by aligning the bands CC and IC with the respective lines on the sheet. Note down positive signals in the last but one column, determine species with the help of the interpretation chart and enter name of the identified species in the last column. The supplied template also serves as an aid for evaluation and must be aligned with the bands CC and IC of the strip as well. Each strip has a total of 17 reaction zones (see figure).



Note: The strip is not displayed in original size.

Conjugate Control (CC)

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

Internal Control (IC)

When the test is performed correctly, a control amplicon will bind to the Internal Control zone.

In case of a positive test result, the signal of the Internal Control zone can be weak or even vanish totally. This might be due to competition of the single reactions during amplification. In this case, the test was performed correctly and does not have to be repeated. Please note, that the positive control C+ does not show the IC band.

When only the CC and IC bands are developed, this represents a valid negative result. A missing IC band in case of a negative test result indicates mistakes during DNA extraction or during setup and/or performance of the amplification reaction, or the presence of amplification inhibitors. In this case, the test result is not valid and the test has to be repeated with the respective sample.

Genus Control (GC)

Staining of this zone documents the presence of a member of the genus *Mycobacterium*. The intensity of this band varies depending on the mycobacterial species.

When a species-specific banding pattern has developed, the GC band may be weak or even drop out completely due to competition of the single reactions during amplification. The test result, however, is to be assessed as valid.

Other bands

Specific probes, for evaluation see interpretation chart.

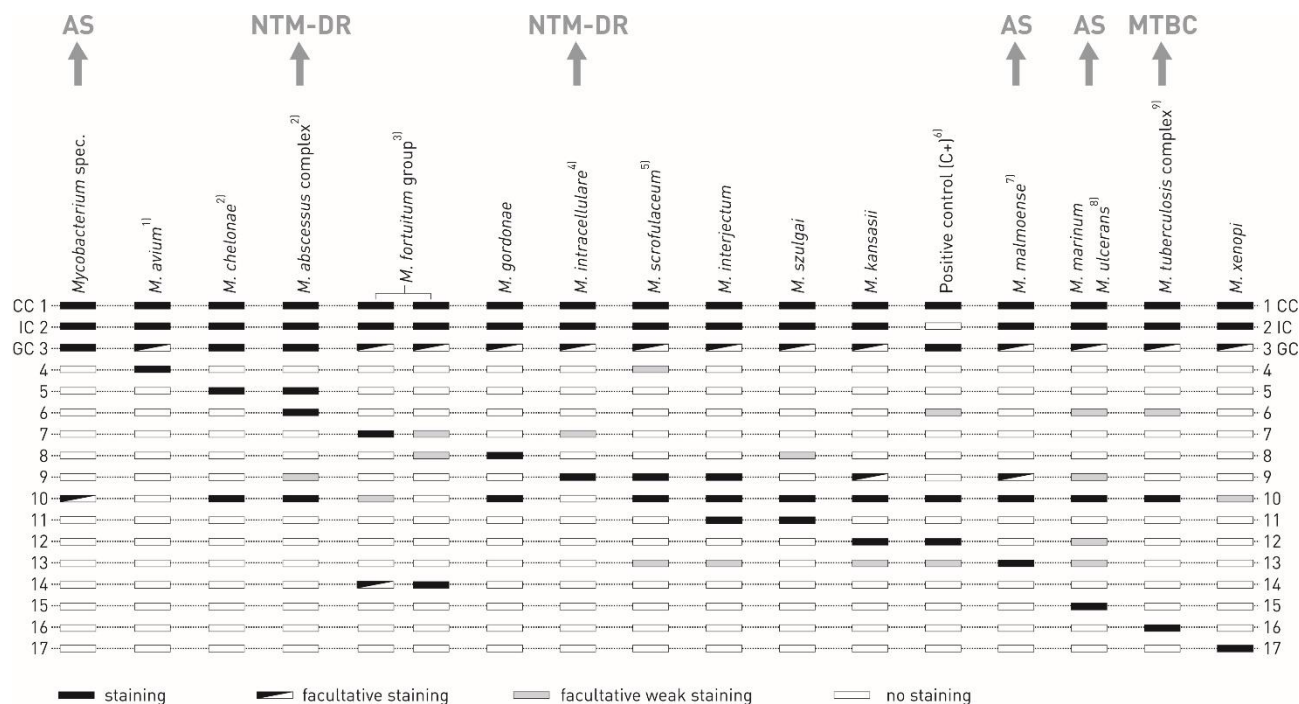
Please note:

Not all bands of a strip have to show the same signal strength. Generally, only those bands whose intensities are about as strong as or stronger than that of the Internal Control zone (IC) are to be considered (exceptions: see chapter Interpretation Chart).

Additional mycobacterial species can be identified with the **GenoType Mycobacterium AS** kit (see Interpretation Chart).

An amplicon generated with the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 can directly be hybridized to **GenoType Mycobacterium AS** strips.

Interpretation Chart



Band No. 1 (CC): Conjugate Control

Band No. 2 (IC): Internal Control

Band No. 3 (GC): Genus Control

AS: GenoType Mycobacterium AS

MTBC: GenoType MTBC

NTM-DR: GenoType NTM-DR

¹⁾ Does not include other species of the *M. avium* complex.

²⁾ *M. immunogenum* shows the same banding pattern as *M. chelonae* or the *M. abscessus* complex.

Members of the *M. abscessus* complex can be differentiated with the **GenoType NTM-DR** kit.

³⁾ Of the *M. fortuitum* group, only the following members have been tested: *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. alvei*, and *M. septicum*. It has not been tested whether other members of the *M. fortuitum* group also show this banding pattern.

M. fortuitum shows the banding pattern as depicted in the left column.

In most cases, *M. peregrinum* shows the banding pattern as depicted in the right column. In rare cases however, *M. peregrinum* may show the banding pattern as depicted in the left column.

M. alvei and *M. septicum* show the banding pattern as depicted in the right column.

Species not belonging to the *M. fortuitum* group:

M. mageritense shows the banding pattern as depicted in the left column without band 14.

Rare *M. smegmatis* variants may also show the banding pattern as depicted in the left column without band 14. In this case, however, band 7 shows only a weak signal.

⁴⁾ *M. marseillense* and *M. chimaera* (both members of the *M. avium* complex) show the same banding pattern as *M. intracellulare*.

M. intracellulare and *M. chimaera* can be differentiated with the **GenoType NTM-DR** kit.

⁵⁾ *M. paraffinicum* and *M. parascrofulaceum* show the same banding pattern as *M. scrofulaceum*.

⁶⁾ The positive control [C+] shows an *M. kansasii* banding pattern without IC band.

⁷⁾ *M. haemophilum*, *M. palustre*, and *M. nebraskense* show the same banding pattern as *M. malmoense*.

M. haemophilum/*M. nebraskense* can be identified with the **GenoType Mycobacterium AS** kit.

⁸⁾ *M. ulcerans* can be identified with the **GenoType Mycobacterium AS** kit.

⁹⁾ Members of the *M. tuberculosis* complex can be differentiated with the **GenoType MTBC** kit.

Important notes for evaluation

M. chelonae and the *M. abscessus* complex cannot be differentiated if the amplicon hybridizing to both the Genus Control and to band 6 is suppressed due to competition of the single reactions during amplification. Therefore, a developed GC band is required for identification of *M. chelonae* and of the *M. abscessus* complex.

M. scrofulaceum and *M. malmoense* can only be differentiated by means of the intensity of band 13 when the specific bands 9, 10, and 13 are developed. If the intensity of band 13 is weaker than that of the IC band, the banding pattern indicates the presence of *M. scrofulaceum*. If the intensity of band 13 is as strong as or stronger than the IC band, the banding pattern indicates the presence of *M. malmoense*.

For *M. szulgai*, the intensity of band 11 may be weaker than that of the IC band.

For the *M. tuberculosis* complex, the intensity of bands 10 and/or 16 may be weaker than that of the IC band.

If band 15 has also stained positive, additional detection methods must be applied.

Limitations

Strictly adhere to the established protocols and procedures in order to obtain correct test results and to avoid contaminations.

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

The results of this test may only be interpreted in combination with additional laboratory and clinical data available to the responsible physician.

The test reflects the current state of knowledge of Hain Lifescience.

Members of the *M. tuberculosis* complex cannot be differentiated. Likewise, members of the *M. abscessus* complex cannot be differentiated.

If more than one species is assigned to a banding pattern, these species cannot be discriminated with this test system.

In case a bacterial strain does not belong to one of the species identifiable with the **GenoType Mycobacterium CM** but is closely related to one of them, it may, in rare cases, generate the banding pattern of the closely related species detectable with the test.

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

As any detection system based on hybridization, 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 subtypes might not be detected.

Performance evaluation of this assay was carried out with the **GenoLyse®** kit for DNA extraction from cultured material. The performance of the test has not been validated with other DNA extraction methods or sample materials.

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.

Repeat reverse hybridization.

Weak or no signals except for Conjugate Control zone

- Quality of extracted DNA does not allow an efficient amplification. Repeat extraction.
- Amplification Mixes (AM-A and AM-B) were not mixed properly, interchanged, or added in wrong amounts. Prepare a new master mix and repeat amplification.
- Incubation temperature too high. Repeat reverse hybridization.

No homogeneous staining

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

Repeat reverse hybridization.

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.

Repeat reverse hybridization.

Unexpected result

- Wrong incubation temperature.
 - Hybridization Buffer and/or Stringent Wash Solution were not properly prewarmed or mixed.
 - Contamination of neighboring wells by spillage during addition of Hybridization Buffer.
- Repeat reverse hybridization.**
- Contamination of extracted DNA with previously extracted or amplified DNA. Repeat extraction.
 - Contamination of amplification reagents. In this case, a negative control sample shows additional bands besides CC and IC. Repeat amplification using fresh reagents.
 - 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. Re-culture in order to exclude contamination.
 - Error during DNA extraction. Repeat extraction.
 - IC and C+ interchanged. In this case, the negative control and negative samples show an *M. kansasii* banding pattern without IC band and the positive control (if included) does not show the *M. kansasii* banding pattern, but only bands CC and IC. The banding pattern of positive samples is mostly not interpretable. Repeat extraction.

Ordering Information

Order no.

| | |
|---|--------|
| GenoType Mycobacterium CM VER 2.0 (kit for analysis of 12 samples) | 299A |
| GenoType Mycobacterium CM VER 2.0 (kit for analysis of 96 samples) | 29996A |
| GenoLyse® (kit for manual DNA extraction of 12 samples) | 51612 |
| GenoLyse® (kit for manual DNA extraction of 96 samples) | 51610 |
| GenoType Mycobacterium AS (kit for analysis of 12 samples) | 298 |
| GenoType Mycobacterium AS (kit for analysis of 96 samples) | 29896 |
| GenoType MTBC (kit for analysis of 12 samples) | 301 |
| GenoType MTBC (kit for analysis of 96 samples) | 30196 |
| GenoType NTM-DR (kit for analysis of 12 samples) | 29712 |
| GenoType NTM-DR (kit for analysis of 96 samples) | 29796 |

Performance Characteristics

For the performance evaluation of the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0, the test was carried out according to the instructions on hand.

Diagnostic performance

Diagnostic performance characteristics of the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 were determined with 114 cultivated samples.

The **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 was compared to culture (successful cultivation on Loewenstein-Jensen solid medium or in MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA) and subsequent species identification using the **GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0).

DNA extraction was performed with the **GenoLyse**[®] kit according to the instructions for use.

Test results were rated true positive if the result of the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 was in agreement with that obtained with culture/**GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0.

Table 1: Performance characteristics of the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 for detection of mycobacteria from cultured material compared to culture/**GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0 (GT Myco CM V1)

| GenoType
Mycobacterium CM
VER 2.0 | Culture/GT Myco CM V1 | | Diagnostic sensitivity: 100% | |
|---|-----------------------|-------------------|------------------------------|---------------------------------|
| | | Positive | Negative | Diagnostic specificity: 100% |
| | Positive | 105 ¹¹ | 0 | Positive predictive value: 100% |
| | Negative | 0 | 9 | Negative predictive value: 100% |

¹¹ The 105 samples were identified as 7x *M. abscessus* complex, 15x *M. avium*, 6x *M. fortuitum* group (*M. fortuitum*), 8x *M. goodii*, 16x *M. intracellulare*, 6x *M. kansasii*, 6x *M. malmoense*, 5x *M. marinum*/*M. ulcerans*, 2x *M. scrofulaceum*, 1x *M. tuberculosis* complex, 5x *M. xenopi*, 5x *M. chelonae*, and 23x *Mycobacterium* spec.

Analytical performance

Analytical specificity

The specificity of the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 is ensured by the accurate design of specific primers and probes which considers, among others, homology comparisons of the sequences published in gene databases, and by stringent reaction conditions.

The analytical specificity of the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 was determined with strains of all mycobacteria identifiable by this test, as well as with strains of mycobacterial and non-mycobacterial species that are not detectable with the test system.

All mycobacteria identifiable with this assay generated the correct specific banding pattern. Isolates of the mycobacterial species not identifiable with the test system and of all tested non-mycobacterial species displayed no specific banding pattern. Hence, the analytical specificity for the specific probes of the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 strip was 100%.

The same samples were also evaluated for performance of the Genus-specific probe (GC). An analytical specificity of 98.6% was determined for this probe.

Strains of all mycobacteria identifiable with the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 were tested:

| | | | |
|----------------------------|------------------------|---|--|
| <i>M. avium</i> | <i>M. szulgai</i> | <i>M. abscessus</i> complex | <i>M. tuberculosis</i> complex |
| <i>M. chelonae</i> | <i>M. kansasii</i> | (<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> , | (<i>M. tuberculosis</i> , |
| <i>M. immunogenum</i> | <i>M. malmoense</i> | <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> , | <i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i> , |
| <i>M. mageritense</i> | <i>M. haemophilum</i> | <i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>) | <i>M. bovis</i> subsp. <i>caprae</i> , |
| <i>M. goodii</i> | <i>M. marseillense</i> | | <i>M. bovis</i> BCG, |
| <i>M. intracellulare</i> | <i>M. palustre</i> | <i>M. fortuitum</i> group | <i>M. africanum</i> , |
| <i>M. chimera</i> | <i>M. nebraskense</i> | (<i>M. fortuitum</i> , | <i>M. microti</i> , |
| <i>M. scrofulaceum</i> | <i>M. marinum</i> | <i>M. peregrinum</i> , | <i>M. canettii</i> , |
| <i>M. parascrofulaceum</i> | <i>M. ulcerans</i> | <i>M. alvei</i> , | <i>M. pinnipedii</i>) |
| <i>M. paraffinicum</i> | <i>M. xenopi</i> | <i>M. septicum</i>) | |
| <i>M. interjectum</i> | | | |

Tested mycobacterial species that are not identifiable with the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0:

| | | | |
|---------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------|
| <i>M. asiaticum</i> | <i>M. goodii</i> | <i>M. mucogenicum</i> | <i>M. simiae</i> |
| <i>M. celatum</i> | <i>M. heckeshornense</i> | <i>M. phlei</i> | <i>M. smegmatis</i> |
| <i>M. gastri</i> | <i>M. intermedium</i> | <i>M. shimoidei</i> | <i>M. triplex</i> |
| <i>M. genavense</i> | <i>M. lentiflavum</i> | | |

Tested non-mycobacterial species that are not identifiable with the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0:

| | | | |
|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Bordetella pertussis</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| <i>Corynebacterium ulcerans</i> | <i>Nocardia amarae</i> | <i>Rhodococcus erythropolis</i> | <i>Streptomyces somaliensis</i> |
| <i>Corynebacterium xerosis</i> | <i>Nocardia asteroides</i> | <i>Rhodococcus rhodochrous</i> | <i>Tsukamurella incheonensis</i> |
| <i>Escherichia coli</i> | <i>Nocardia farcinica</i> | <i>Rhodococcus ruber</i> | <i>Tsukamurella paurometabola</i> |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | <i>Nocardia otidiscaviarum</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Tsukamurella pulmonis</i> |

Analytical sensitivity (limit of detection, LOD)

For determination of analytical sensitivity of the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 for cultured material, four BCG culture dilutions (1.65×10^4 , 1.65×10^5 , 1.65×10^6 and 1.65×10^7 CFU/ml) were set up in triplicate. Including a negative control, DNA was extracted using the **GenoLyse**[®] kit and analyzed with the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 applying the "MDR CUL" PCR protocol. The limit of detection was 1.65×10^5 CFU/ml.

Reproducibility

The intra-assay precision and the inter-assay precision were determined with the following four samples:

- BCG culture dilution above the limit of detection
- BCG culture dilution at the limit of detection
- *Bordetella pertussis*-positive DNA sample
- Negative control

DNA was extracted using the **GenoLyse®** kit and the isolates were analyzed with the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 applying the “MDR CUL” PCR protocol.

In order to determine the intra-assay precision, the samples were set up in four parallels and analyzed under identical conditions (same kit lot, same instrument, same operator, same point in time, etc.) in one PCR run. All parallels showed identical and correct banding patterns and comparable signal strengths. Hence, an intra-assay precision of 100% was achieved.

In order to determine the inter-assay precision, the samples were analyzed on three different days. The other experimental conditions (kit lot, instrument, operator, etc.) were identical. All parallels showed identical and correct banding patterns and comparable signal strengths. Hence, an inter-assay precision of 100% was achieved.

Interfering substances

There are substances that may inhibit PCR reactions. Such inhibitors may, for example, originate from the culture medium. In order to assess if the medium influences the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0, six different *M. tuberculosis* complex strains were cultured in four different media (solid media: Loewenstein-Jensen, Stonebrink, and Middlebrook-7H10, liquid medium: MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)). Then the DNA was extracted using the **GenoLyse®** kit and the isolates were analyzed with the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 applying the “MDR CUL” PCR protocol.

All samples showed the correct results with all tested media. Hence, it can be excluded that the tested media import inhibitors into the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 test.

Stability

Shelf life of the **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 when stored as recommended: see box label.

Stability is determined according to DIN EN ISO 23640.

References

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. World Health Organization, Geneva, Switzerland 2020.
2. Falkinham JO 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 177-215.
3. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th edition. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 2009.
4. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards), USA, Document M29 (please refer to the latest version).

Important Changes in IFU-299A-03

| Chapter | Change |
|---|--|
| Reagents and Instruments | The former chapters "Kit Contents", "Storage and Disposal of Kit Constituents", "Precautions for Handling Kit Constituents", and "Material Required but not Included in the Kit" are now subchapters of the new heading "Reagents and Instruments". |
| Precautions for Handling Kit Constituents | The hazard labeling now refers to safety data sheets. For additional information on the hazardous substances included in the kit, please refer to the safety data sheets which can be downloaded from: www.hain-lifescience.com/products/msds.html |
| Sample Requirements | The former chapter "Specimen Requirements" was renamed "Sample Requirements".
New: "All culture samples that may contain mycobacteria should be handled applying Biosafety Level 2 practices or, when indicated, Biosafety Level 3 practices (e.g. see [3]). Observe all federal, state, and local safety regulations."
New: "Transport, storage and preparation of patient specimens and culture samples should be carried out according to local, national and/or international guidelines and standards of the laboratory." |



Hain Lifescience GmbH

Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany
www.hain-lifescience.de, +49 (0) 74 73- 94 51- 0

GenoType Mycobacterium CM

VER 2.0

Руководство к пользованию

IFU-299A-03

CE

IVD только для диагностики in vitro

2021-08-09



GenoType Mycobacterium CM VER 2.0
Молекулярно-генетическое исследование для индентификации клинически важных видов микобактерий выделенных из культурального материала

Пожалуйста, перед тем как начать работу с набором, внимательно изучите всю инструкцию по применению. Чтобы получить правильные результаты тестирования, строго придерживайтесь установленной процедуры.

Предназначение

GenoType Mycobacterium CM VER 2.0 - это качественный *in vitro* тест для идентификации комплекса *Mycobacterium tuberculosis*, а так же следующих нетуберкулёзных микобактерий из культурального материала: *M. avium*, *M. chelonae*, комплекс *M. abscessus*, группы *M. fortuitum*, *M. goodii*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*/*M. ulcerans* и *M. xenopi*.
Данный тест показан для диагностических целей и предназначен для использования в медицинских лабораториях.

Резюме и пояснения

Микобактериозы – это инфекционные заболевания, вызванные бактериями рода *Mycobacterium*. Наиболее значимым является туберкулёз (ТБ), который вызывается представителями комплекса *Mycobacterium tuberculosis*. В 2019, в мире было зарегистрировано приблизительно 10 миллионов случаев ТБ, и приблизительно 1,4 миллиона смертельных исхода. [1].

Патогены ТБ – это неподвижные, облигатные, аэробные, кислотоустойчивые бациллы, принадлежащие семейству *Mycobacteriaceae*. Они грам-положительны и отличаются высоким содержанием геномных G+C (59-66%). Род *Mycobacterium* объединяет многочисленные виды, которые можно подразделить на 3 группы: (i) комплекс *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* subsp. *bovis*, *M. bovis* subsp. *caprae*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. canettii*, и *M. pinnipedii*), (ii) *M. leprae* вызывающие лепру, и (iii) атипичные или нетуберкулёзные микобактерии (NTM). В связи с различной степенью патогенности и непатогенности некоторых видов, быстрая и точная идентификация комплекса *M. tuberculosis* и последующая его дифференциация от NTM – является наиважнейшей задачей.

NTM могут вызвать хронические микобактериозы. Инфекционность и симптомы в значительной степени вариабельны и зависят как от патогена, так и от состояния иммунного статуса поражённого лица [2]. У лиц с иммуносупрессией, как, например, у ВИЧ – инфицированных или у пациентов с лейкоемией, наиболее вероятно развитие тяжёлых форм микобактериоза.

Набор **GenoType Mycobacterium CM** позволяет проводить быструю и достоверную дифференциацию соответствующих микобактерий и, т.о., ускорить назначение специфического лечения и предпринять превентивные меры. Если не было возможности идентифицировать при помощи данного теста единичные виды, это специфичное определение можно выполнить применяя набор **GenoType Mycobacterium AS** (см. Таблица интерпретации).

Принцип тестирования

Тест **GenoType Mycobacterium CM VER 2.0** основан на **DNA•STRIP** технологии. Процедура проведения теста подразделяется на три этапа: (i) Выделение ДНК из культур (выросших на плотной или жидкой среде; необходимые для этого реагенты в наборе не поставляются), (ii) мультиплексная амплификация с биотинилированными праймерами, (iii) реверс-гибридизация.

Все реагенты, необходимые для амплификации, например, полимераза или праймеры включены в Амплификационную Смесь А и В (АМ-А и АМ-В) и оптимизированы для данного теста. Мембраны стрипов покрыты специфическими зондами, комплементарными к амплифицированным нуклеиновым кислотам. После химической денатурации, одноцепочечные ампликоны связываются с зондами (гибридизация). Высоко специфичное связывание комплементарных цепей ДНК обусловлено жёсткими условиями, которые создаются в результате оптимального сочетания состава буфера и определённой температуры. Таким образом, зонды достоверно дифференцируют различные последовательности бактериальных видов. Конъюгированная стрептавидином щелочная фосфатаза связывается с биотином ампликонов посредством фрагментов стрептавидина. В итоге, щелочная фосфатаза превращает добавленный субстрат в окрашенную форму, которая становится видимой на мембране стрипов, как цветной преципитат. Простая и быстрая оценка полученных результатов проводится с помощью прилагаемого шаблона.

Реагенты и инструменты

| | | |
|---|-------------|---------------|
| Состав набора | | |
| Номер для заказа | 299A | 29996A |
| Количество тестов | 12 | 96 |
| Состав Комплекта 1 из 2 (хранить при температуре от 2°C до 8°C) | | |
| Мембранные стрипы, покрытые специфическими пробами (Mycobacterium CM VER 2.0 STRIPS) | 12 | 2x 48 |
| Денатурирующий Раствор (DEN)
содержит <2% NaOH, краситель | 240 мкл | 2x 960 мкл |
| Гибридационный Буфер (HVB)
содержит <10% анионное активное вещество, краситель | 12 мл | 96 мл |
| Раствор для Жесткой Промывки (STR)
содержит >25% четвертичных соединений аммиака, <1% анионных активных веществ, краситель | 12 мл | 96 мл |
| Раствор для Промывки (RIN)
содержит буфер, <1% NaCl, <1% неионогенное активное вещество | 36 мл | 3x 96 мл |
| Концентрат Конъюгата (CON-C)
содержит стрептавидин-конъюгированную щелочную фосфатазу, краситель | 120 мкл | 960 мкл |
| Буфер для Конъюгата (CON-D)
содержит буфер, 1% блокирующего реагента, <1% NaCl | 12 мл | 96 мл |

| | | |
|---|---------|---------|
| Субстратный Концентрат (SUB-C)
содержит <70% диметилсульфоксида, <10% 4-нитро синего тетразолия хлорида,
<10% 5-бромо-4-хлоро-3-индолил фосфата | 120 мкл | 960 мкл |
| Субстратный буфер (SUB-D)
содержит буфер, <1% MgCl ₂ , <1% NaCl | 12 мл | 96 мл |
| Эталон для оценки | 1 | 4 |
| Руководство к пользованию | 1 | 1 |
| Этикетка партии | 3 | 3 |

Состав Комплекта 2 из 2 (хранить при температуре от –20°C до –18°C)

| | | |
|---|---------|------------|
| Амплификационная Смесь А (AM-A GT Mycobacterium CM VER 2.0)
состоит из буфера, нуклеотидов, Таг полимеразы | 120 мкл | 4x 240 мкл |
| Амплификационная Смесь В (AM-B GT Mycobacterium CM VER 2.0)
состоит из солей, специфических праймеров, красителя | 420 мкл | 4x 840 мкл |
| Внутренний Контроль ДНК (IC GT Mycobacterium CM VER 2.0)
содержит бактериальную ДНК | 192 мкл | 192 мкл |
| Контроль ДНК (C+ GT Mycobacterium CM VER 2.0)
содержит бактериальный контроль ДНК | 95 мкл | 95 мкл |

Хранение и утилизация компонентов набора

1/2 Состав Комплекта 1 из 2

2/2 Состав Комплекта 2 из 2

Хранить все Компоненты Комплекта 1 при температуре от 2°C до 8°C. Компоненты Комплекта 2 хранить при температуре от –20°C до –18°C и строго изолировано от контаминирующей ДНК.

Внутренний Контроль ДНК (IC) должен храниться при температуре от –20°C до –18°C в том же помещении, где выделяют ДНК.

Контроль ДНК (C+) должен храниться при температуре от –20°C до –18°C в том же помещении, где вносят ДНК в пробирки с аликвотированными мастер миксами.

Повторно заморозьте AM-A, AM-B, IC и C+ сразу после использования.

Не допускайте повторных циклов замораживания и оттаивания (>4x) AM-A, AM-B, IC и C+; при обработке небольшого количества образцов за одно тестирование, аликвотируйте AM-A, AM-B, IC и C+.

После окончания срока годности, реактивы не использовать. Утилизация и уничтожение неиспользованных реагентов должны происходить в строгом соответствии с федеральными, государственными и местными законами.

Меры предосторожности при работе с компонентами набора

Необходимо соблюдать федеральные, государственные и местные законы безопасности труда и охраны окружающей среды. Нужно всегда использовать защитную одежду, перчатки и средства защиты глаз.

Для получения дополнительной информации об опасных веществах в составе комплекта, пожалуйста, обратитесь к материалам по безопасности работы, которые можно загрузить с сайта: www.hain-lifescience.com/products/msds.html

Конъюгатный концентрат (**CON-C**) и буфер для конъюгата (**CON-D**) содержат биологический материал. Соответственно, их следует рассматривать как потенциально опасные и обращаться с ними соответствующим образом (напр., см. [3] или [4]).

Необходимые, но не поставляемые материалы

- Фильтровальная бумага
- Микропипетки на 10, 20, 200 и 1000 мкл
- Одноразовые перчатки
- Одноразовые стерильные наконечники с фильтром
- Мерный цилиндр
- ПЦР-пробирки без ДНКаз и РНКаз
- Водяная баня с шейкером + Горизонтальная платформа **или** TwinCubator (аппарат для мануальной гибридизации) **или** аппарат для автоматической гибридизации)
- Термоциклер
- Таймер
- Пинцет
- Наборы для выделения ДНК (**GenoLyse**®, см. главу Информация для заказа) а также необходимое оборудование
- Реагенты для культивирования микобактерий и необходимое для амплификации оборудование
- Реагенты для деконтаминации образца, а так же необходимое оборудование
- Вода (дистиллированная)

Контроль качества

Чтобы убедиться в корректном проведении тестирования и для контроля функционирования реактивов, каждый стрип имеет 3 контрольные зоны:

- Зона Контроля Конъюгата (CC) для проверки связывания конъюгата со стрипом и правильного выполнения хромогенной реакции
- Зона Внутреннего Контроля (IC), которая документирует успешность выделения ДНК и реакции амплификации
- Зона Контроля Рода (GC), которая подтверждает присутствие представителей рода *Mycobacterium*

При проведении амплификации необходимо соблюдать обычные меры безопасности. Особенно важно, чтобы все реагенты и материалы, используемые для выделения ДНК и проведения амплификации, не содержали ДНК-аз. Не комбинируйте и не пулируйте Амплификационные миксы, контроли или мембранные стрипы из разных наборов, если их лоты не совпадают (исключения: Ампликоны, полученные на наборе **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 можно напрямую гибридизовать со стрипами **GenoType Mycobacterium AS**). Номер партии набора и соответствующие номера партий компонентов набора находятся на этикетках партии, вложенных в комплект.

Этот набор включает один Внутренний Контроль ДНК (IC), который добавляют в каждый образец на этапе экстракции ДНК. Ампликон Внутреннего Контроля ДНК связывается с зоной Внутреннего Контроля на стрипе (см. выше).

Образец отрицательного контроля для выявления случаев возможной контаминации должен стать неотъемлемой частью каждого тестирования и его необходимо включать в каждый комплект образцов на этапе экстракции ДНК. На валидном отрицательном контроле должны быть видны исключительно полосы CC и IC.

Дополнительно во время амплификации в комплект образцов может быть включен положительный контроль, содержащий прилагаемый Контроль ДНК (C+). В Контроле ДНК содержится ДНК *M. kansasii* и на соответственном тест-стрипе появляется полоска, как у *M. kansasii* без Внутреннего Контроля (IC). Предоставленного количества достаточно для 19 образцов положительного контроля.

Во время работы не следует подвергать замене IC и C+, потому что это может вызвать получение ошибочных результатов (см. главу Решение проблем).

Требования к образцу

Микобактерии, выросшие на плотной среде (например, Loewenstein-Jensen, Middlebrook), или на жидкой (например, MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)) используются в качестве исходного материала для выделения ДНК. Тест не может быть использован для прямого определения в образцах пациента.

Меры предосторожности при работе с образцами

Культуральные образцы, полученные из образцов пациентов, всегда должны рассматриваться, как инфекционные, и работать с ними следует соответствующим образом (см. [3] или [4]). Всегда использовать защитную одежду и перчатки. Образцы от пациентов из группы риска (инфицированные патогенными микроорганизмами и вирусами, включая гепатит Б и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)) и культуры, полученные из этих образцов, всегда должны быть промаркированы, и работать с ними необходимо, соблюдая все меры предосторожности, согласно принятым в данном институте правилам.

Со всеми культуральными образцами, которые могут содержать микобактерии, следует обращаться, применяя методики Biosafety Level 2 или, если это указано, методики Biosafety Level 3 (например, см. [3]). Необходимо соблюдать все принятые на федеральном, региональном (на уровне штата) и местном уровне законы по безопасности труда.

Сразу же после использования выбросьте отработанные наконечники пипеток в контейнер для биологически опасных отходов. По окончании исследования, выбросьте все отработанные материалы в контейнер для биологически опасных отходов.

Хранение, транспортировка и подготовка

Транспортировка, хранение и подготовка образцов пациентов и культуральных образцов должны осуществляться в соответствии с местными, национальными и/или международными правилами и стандартами, действующими в лаборатории.

Выделение ДНК

Микобактерии выросшие на плотной среде (например, Loewenstein-Jensen, Middlebrook), или на жидкой (например, MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)) используются в качестве исходного материала для выделения ДНК. Рабочая площадь должна быть чистой от контаминирующей ДНК.

Для выделения ДНК, набор **GenoLyse®** (см. главу Информация для заказа).

Метод, упомянутый здесь, можно использовать для оценки технических характеристик набора **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0. Основные характеристики теста не были валидированы на других методах выделения ДНК или на других образцах.

Амплификация

Все реагенты, необходимые для амплификации, например, полимеразы или праймеры включены в Амплификационную Смесь А и В (АМ-А и АМ-В) и оптимизированы для данного теста. Перед приготовлением основной смеси быстро разморозьте АМ-А и АМ-В, быстро осадите путем центрифугирования и осторожно перемешайте пипетированием. Пипетируйте АМ-А и АМ-В только в комнате, чистой от контаминирующей ДНК. Во избежание контаминации растворы ДНК следует вносить в отдельном рабочем помещении.

Подготовьте для каждого образца:

- 10 мкл АМ-А (см. Состав Комплекта 2)
 - 35 мкл АМ-В (см. Состав Комплекта 2)
 - 5 мкл раствора ДНК
- Конечный объем: 50 мкл

Определите общее количество образцов (количество анализируемых проб + контрольные образцы). Подготовьте необходимое количество пробирок. Подготовьте мастер-микс, содержащий АМ-А и АМ-В и аккуратно, но тщательно перемешайте (не на вортексе). Как альтернатива, содержимое реакционной пробирки АМ-А можно полностью перенести в реакционную пробирку АМ-В. Это доводит мастермикс до для 12 реакций амплификации (набор на 12 тестов) или, соответственно, для 4х 24 реакций амплификации (набор на 96 тестов). Пожалуйста, обратите внимание на то, что мастер микс должен быть свежес-приготовленным каждый раз и его следует сразу использовать. Аликвотируйте по 45 мкл мастер-микса в каждую подготовленную ПЦР-пробирку. В отдельном помещении внесите в каждую аликвоту по 5 мкл раствора ДНК (или C+ для положительного контроля). Повторно заморозьте АМ-А, АМ-В и C+ сразу после использования.

Программа амплификации:

При использовании термоциклера от Hain Lifescience с соответствующими предустановками, выберите протокол "MDR CUL".

| | |
|---|------------|
| 15 мин 95°C | 1 цикл |
| 30 сек 95°C }
2 мин 65°C } | 10 циклов |
| 25 сек 95°C }
40 сек 50°C }
40 сек 70°C } | 20 циклов |
| 8 мин 70°C | 1 цикл |
| Нагрев | ≤2,2°C/сек |

Продукты амплификации могут храниться при температуре от –20°C до +8°C.

Гибридизация

При использовании аппарата для гибридизации от Hain Lifescience, пожалуйста, внимательно изучите документ "Overview equipment programs" доступный на сайте www.hain-lifescience.com, для того, чтобы определить наиболее подходящий для использования протокол гибридизации. Следующий протокол описывает мануальную гибридизацию с использованием водяной бани или TwinCubator.

Подготовка

Предварительно прогреть водяную баню с шейкером до 45°C (максимально допустимое отклонение температуры ±1°C) или включить TwinCubator. Растворы HYB и STR перед применением нужно предварительно прогреть до 37-45°C. В реагентах не должно быть осадка (при этом обратите внимание, что раствор CON-D опалесцирует). При необходимости перемешать растворы. За исключением CON-C и SUB-C, довести остальные растворы до комнатной температуры. В подходящей пробирке разведите Концентрат Конъюгата (CON-C – оранжевый) и Концентрат Субстрата (SUB-C – жёлтый) в соотношении 1:100 в соответствующем буфере (CON-C с CON-D, SUB-C с SUB-D) в необходимом количестве. Хорошо перемешайте и доведите до комнатной температуры. Из расчета на каждый стрип: добавьте 10 мкл концентрата к 1 мл соответствующего буфера. CON-C разводится перед каждым использованием. Разведенный SUB-C можно хранить 4 недели в защищенном от света месте при комнатной температуре.

- Внесите по 20 мкл Денатурирующего Раствора (DEN, голубого цвета) в угол каждой ячейки.
- Добавьте в раствор по 20 мкл продукта амплификации, перемешайте пипетированием и инкубируйте 5 мин при комнатной температуре.
В это время пинцетом выньте стрипы из тубы и подпишите их карандашом под цветной полосой. При работе со стрипами всегда используйте перчатки!
- Осторожно добавьте в каждую ячейку по 1 мл предварительно нагретого Гибридизационного Буфера (HYB, зеленого цвета). Аккуратно покачивайте ванночку до получения гомогенного окрашивания.
Следите, чтобы раствор не попал в соседние ячейки.
- Поместите стрипы в ячейки.
Стрипы должны быть полностью погружены в раствор, лицевой стороной (определяемой по цветной полосе на нижнем конце) вверх. Если стрип перевернулся, его нужно поправить пинцетом. Во избежание контаминации тщательно мойте пинцет после каждого применения. Это важно и на всех последующих этапах теста.
- Поместите ванночку на водяную баню с шейкером/TwinCubator и инкубируйте 30 мин при температуре 45°C.
Установите скорость встряхивания водяной бани так, чтобы жидкость постоянно перемешивалась, но не попадала в соседние ячейки. Чтобы установить равномерное распределение температуры, ванночку погружают в воду на 1/3 высоты.
- Полностью аспирируйте Гибридизационный Буфер.
К примеру, можно использовать пастеровскую пипетку, соединенную с вакуумным насосом.
- Добавьте по 1 мл Раствора для Жесткой Промывки (STR, красного цвета) в каждый стрип и инкубируйте 15 мин при 45°C в водяной бане с шейкером/TwinCubator.
- Далее работайте при комнатной температуре.
Полностью удалите раствор для Жесткой Промывки.
Слейте моющий раствор в контейнер для отходов, а остатки жидкости удалите похлопыванием ванночки по фильтровальной бумаге. Таким же образом поступайте и при следующих этапах отмывки.
- Отмойте каждый стрип в 1 мл Промывающего Раствора (RIN) в течение 1 мин на платформе шейкера/TwinCubator (слейте RIN после инкубации).
- Добавьте по 1 мл разведенного конъюгата (см. выше) в каждый стрип и инкубируйте 30 мин на платформе шейкера/TwinCubator.
- Удалите раствор и промойте каждый стрип дважды по 1 мин в 1 мл Промывающего Раствора (RIN) и один раз 1 мин примерно в 1 мл дистиллированной воды (используйте флакон для промывки) на платформе шейкера/TwinCubator (сливая раствор каждый раз).
После последней промывки тщательно удалите все остатки воды.
- Добавьте по 1 мл разведенного субстрата (см. выше) в каждый стрип и инкубируйте без встряхивания, защищая от света.
В зависимости от условий теста (например, температуры в комнате), время инкубации субстрата, а именно время, пока полоски не станут четко видимыми, может варьировать от 3 до 20 мин. Слишком длительная инкубация может привести к избыточному развитию фоновой окраски, и, тем самым может способствовать неправильной интерпретации результатов.
- Как только полоски станут четко видимыми, остановите реакцию быстрым двукратным промыванием дистиллированной водой.
- Пинцетом удалите стрипы из ванночки и высушите их между двумя слоями фильтровальной бумаги.

Оценка и интерпретация результатов

Подклейте стрипы и храните в защищенном от света месте. Эталон для оценки поставляется в наборе. При использовании этого эталона оценки, наклейте окрашенные стрипы в предназначенные для этого поля, причем полоски СС и IC должны совпадать с соответствующими линиями на эталоне. Отметьте положительные сигналы в предпоследней колонке, определите вид при помощи таблицы интерпретации и запишите название вида в последней колонке. Поставляемый шаблон так же предназначен для оценки результатов и должен совпадать с полосками стрипов СС и IC. На каждом стрипе всего 17 зон реакции (см. рис.).



Обратите внимание: Стрип изображен не в натуральную величину.

Контроль Конъюгата (CC)

В этой зоне должна быть хорошо проявлена линия, подтверждающая эффективность связывания конъюгата и правильность субстратной реакции.

Внутренний Контроль (IC)

Если тест выполнен правильно, контроль ампликонов, свяжется с Зоной Внутреннего Контроля на стрипе.

В случае положительного результата тестирования, сигнал в зоне Внутреннего Контроля может быть слабым или совсем невидимым. Это может быть вызвано конкурентными реакциями во время амплификации. В этом случае, тестирование считается выполненным правильно и не требует повторения. Пожалуйста, обратите внимание, на то, что положительный контроль С+ не проявляет полоску IC.

Если развились только полоски СС и IC, это значит, что отрицательный результат верен. Отсутствие полоски IC в случае отрицательного результата, свидетельствует об ошибке на этапе выделения ДНК и/или по ходу реакции амплификации, или указывает на присутствие ингибиторов амплификации. В этом случае результаты тестирования недействительны и необходимо повторное тестирование соответствующего образца.

Контроль Рода (GC)

Окрашивание этой зоны документирует присутствие представителя рода *Mycobacterium*. Интенсивность этой полоски варьирует в зависимости от вида микобактерии.

Когда видо-специфичная полоска шаблона развилась, полоска GC может быть очень слабой или даже совсем отсутствовать из-за конкуренции во время одной реакции амплификации. Тем не менее, результат теста считается действительным.

Другие полоски

Специфические пробы, для оценки смотрите в таблице интерпретации.

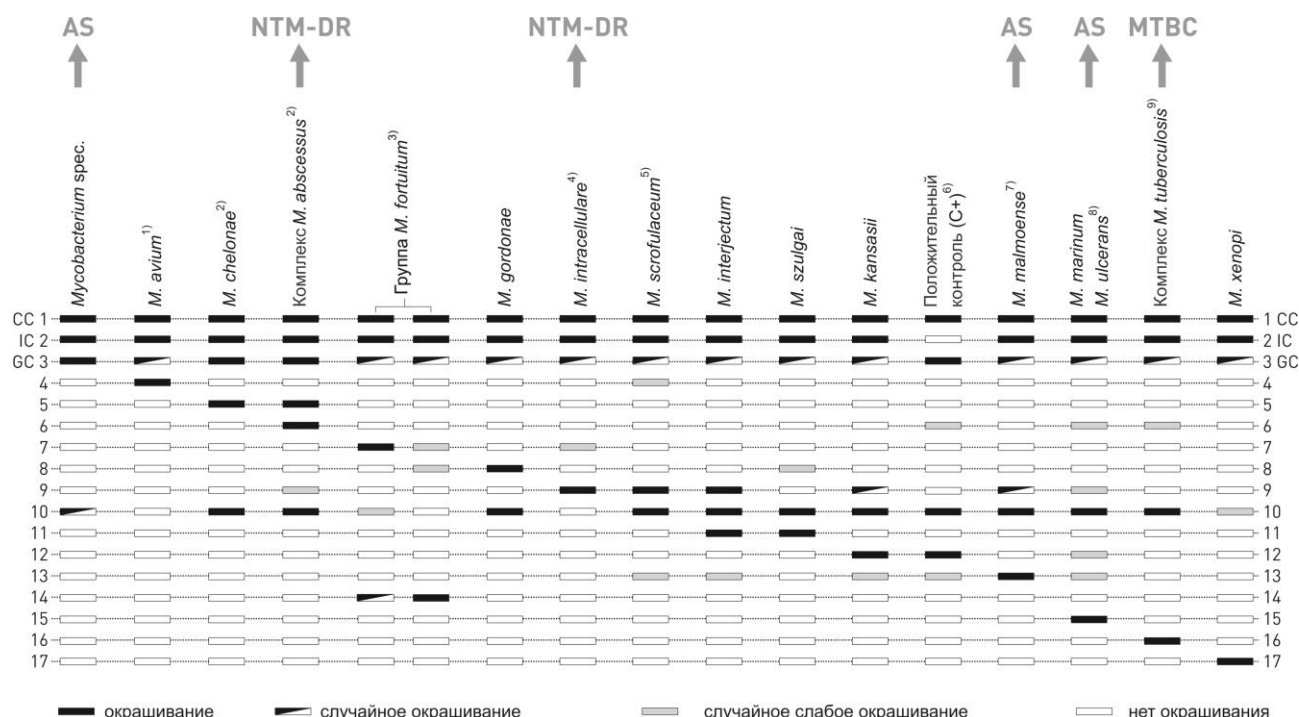
Пожалуйста, обратите внимание:

Не все полоски на стрипе могут показывать одинаковую силу сигнала. Только полоски с интенсивностью сигнала такой же или более интенсивной, чем в зоне Внутреннего Контроля (IC), могут приниматься во внимание (исключения: смотрите главу Таблица интерпретации).

Некоторые дополнительные виды микобактерий можно идентифицировать при помощи набора **GenoType Mycobacterium AS** (см. Таблица интерпретации).

Ампликоны, полученные на наборе **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 можно напрямую гибридизовать со стрипами **GenoType Mycobacterium AS**.

Таблица интерпретации



Полоска №1 (CC): Контроль Коньюгата

Полоска №2 (IC): Внутренний Контроль

Полоска №3 (GC): Контроль Рода

AS: **GenoType Mycobacterium AS**

MTBC: **GenoType MTBC**

NTM-DR: **GenoType NTM-DR**

1) Не включает другие виды комплекса *M. avium*.

2) *M. immunogenum* проявляет такие же линии, как и *M. chelonae* или комплекса *M. abscessus*.

Представители комплекса *M. abscessus* могут быть дифференцированы на наборе **GenoType NTM-DR**.

3) В группе *M. fortuitum* только перечисленные далее виды были протестированы: *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. alvei* и *M. septicum*. Так же не было протестировано, проявляют ли другие представители группы *M. fortuitum* такой же шаблон полосок.

M. fortuitum проявляет линии как изображено в колонке слева.

В большинстве случаев, *M. peregrinum* проявляет линии как изображено в колонке справа. В редких случаях, однако, *M. peregrinum* может показать линии как изображено в колонке слева.

M. alvei и *M. septicum* проявляют линии как изображено в колонке справа.

Виды, не относящиеся к группе *M. fortuitum*:

M. mageritense проявляет линии как изображено в колонке слева без полоски 14.

Редкие варианты *M. smegmatis* так же могут проявлять полоски как изображено в колонке слева без полоски 14. Тем не менее, в этом случае полоска 7 проявляет только слабый сигнал.

4) *M. marseillense* и *M. chimaera* (оба вида относятся к комплексу *M. avium*) проявляют такие же полоски, как *M. intracellulare*.

M. intracellulare и *M. chimaera* могут быть дифференцированы на наборе **GenoType NTM-DR**.

5) *M. paraffinicum* и *M. parascrofulaceum* показывают такие же полоски, как *M. scrofulaceum*.

6) Положительный контроль (C+) показывает полосу, характерную для *M. kansasii* без полоски Внутреннего Контроля (IC).

7) *M. haemophilum*, *M. palustre* и *M. nebraskense* показывают такие же полоски, как *M. malmoense*.

M. haemophilum/*M. nebraskense* можно идентифицировать на наборе **GenoType Mycobacterium AS**.

8) *M. ulcerans* можно идентифицировать на наборе **GenoType Mycobacterium AS**.

9) Представители комплекса *M. tuberculosis* могут быть дифференцированы на наборе **GenoType MTBC**.

Важные замечания для оценки результатов

M. chelonae и комплекс *M. abscessus* не может быть дифференцирован, если ампликоны, гибридизованные и к линии Контроль Рода (GC) и к полоске 6 супрессируются посредством конкуренции единичных реакции на этапе амплификации. Поэтому развитие полоски GC требуется для идентификации *M. chelonae* и комплекса *M. abscessus*.

M. scrofulaceum и *M. malmoense* дифференцированы только по значениям интенсивности полоски 13, при развитии специфических полосок 9, 10 и 13. Если интенсивность полоски 13 слабее, чем интенсивность полоски Внутреннего Контроля (IC), это указывает на присутствие *M. scrofulaceum*. Если же интенсивность полоски 13 равносильна или более выражена, чем интенсивность полоски Внутреннего Контроля (IC), это указывает на присутствие *M. malmoense*.

Для *M. szulgai*, интенсивность полоски 11 может быть слабее, чем полоска IC.

Для комплекса *M. tuberculosis*, интенсивность полоски 10 и/или 16 может быть слабее, чем полоска IC.

Если полоска 15 тоже положительно окрасилась, необходимо применить дополнительные методы детекции.

Ограничения метода

Чтобы получить правильные результаты и избежать контаминации, строго придерживайтесь установленного протокола и процедуры тестирования.

Этот тест может проводиться только обученным высококвалифицированным персоналом, который знаком с молекулярно-биологическими методами. Результаты тестирования должны интерпретироваться совместно с результатами других лабораторных исследований и клинических данных, доступных для лечащего врача.

Данный тест отражает знания, накопленные на сегодняшний день компанией Hain Lifescience.

Данным методом нельзя дифференцировать виды, входящие в комплекс *M. tuberculosis*. Так же и члены комплекса *M. abscessus* не могут быть идентифицированы.

Если больше, чем один вид выявляется по полоскам шаблона, то эти виды нельзя различить данной тест-системой.

В случае, если бактериальный штамм не принадлежит ни к одному из видов, идентифицируемых набором **GenoType Mycobacterium CM**, но тесно связан с ними, то крайне редко они могут вызывать окрашивание полосок шаблона близких видов, улавливаемых этой тест-системой.

Присутствие нескольких видов бактерий в анализируемом образце может помешать правильной интерпретации теста.

Как и в любой системе детекции на основе гибридизации, в данной тест-системе допускается возможность того, что вариации последовательности в участке генома, для которого выбраны праймеры и пробы, но для детекции которых тест-система не предназначена, могут привести к ложным результатам. По причине высокой вариабельности бактериального генома, возможно, что определенные подтипы не будут распознаны.

Оценка технических характеристик для этого исследования была выполнена с использованием набора **GenoLyse®**, предназначенного для экстракции ДНК из культурального материала. Основные характеристики теста не были валидированы на других методах выделения ДНК или на других образцах.

Решение проблем

Сплошные слабые сигналы или отсутствие сигналов (включая зону Контроля Конъюгата)

- Комнатная температура слишком низкая или реактивы не доведены до комнатной температуры.
- Отсутствует или в недостаточном количестве внесён CON-C и/или SUB-C.

Повторите этап реверс-гибридизации.

Слабые сигналы или их отсутствие за исключением зоны Контроля Конъюгата

- Качество выделенной ДНК оказалось несоответствующим для проведения реакции амплификации. Повторите выделение.
- Амплификационные Смеси (AM-A и AM-B) недостаточно хорошо перемешаны или добавлены в ошибочном количестве. Подготовьте новый мастер микс и повторите амплификацию.
- Температура инкубации слишком высокая. Повторите этап реверс-гибридизации.

Негомогенное окрашивание

- Во время инкубации, стрипы не были полностью погружены в раствор.
- Ванночка недостаточно встряхивалась.

Повторите этап реверс-гибридизации.

Сильное фоновое окрашивание

- Использовались слишком концентрированные растворы CON-C и/или SUB-C.
- Этапы промывки не были выполнены соответствующим образом.
- Отмывающие растворы слишком холодные.

Повторите этап реверс-гибридизации.

Неожиданный результат

- Неверная температура инкубации.
- Гибридизационный Буфер и/или Раствор для Жесткой Промывки недостаточно нагреты или перемешаны.
- Контаминация между соседними ячейками во время добавления Гибридизационного Буфера.
Повторите этап реверс-гибридизации.
- Контаминация выделенной ДНК фрагментами ДНК, выделенной или амплифицированной ранее. Повторите выделение.
- Контаминация реагентов для амплификации. В этом случае, отрицательный контроль образца проявится в виде дополнительной полоски возле CC и IC. Повторите амплификацию с новыми реагентами.
- В зависимости от количества введенной амплифицированной ДНК и специальных условий реакции, может происходить интенсивное окрашивание и быстрое развитие цветной реакции. В таких случаях, остановите инкубацию, как только полосы станут видимы, чтобы предотвратить развитие перекрёстно-гибридизированных полос.
- Исходный материал не является чистой культурой. Повторите культивирование, чтобы исключить контаминацию.
- Ошибка на этапе выделения ДНК. Повторите выделение.
- IC и C+ заменены. В этом случае отрицательный контроль и отрицательные образцы показывают полоску *M. kansasii* без полоски IC, а положительный контроль (если включён) не показывает полоску *M. kansasii*, а только полоски CC и IC. Полоска положительных образцов, в основном, не интерпретируема. Повторите выделение.

Информация для заказа

Номер для заказа

| | |
|---|--------|
| GenoType Mycobacterium CM VER 2.0 (набор для анализа 12 образцов) | 299A |
| GenoType Mycobacterium CM VER 2.0 (набор для анализа 96 образцов) | 29996A |
| GenoLyse® (набор для ручного выделения ДНК, рассчитанный на 12 образцов) | 51612 |
| GenoLyse® (набор для ручного выделения ДНК, рассчитанный на 96 образцов) | 51610 |
| GenoType Mycobacterium AS (набор для анализа 12 образцов) | 298 |
| GenoType Mycobacterium AS (набор для анализа 96 образцов) | 29896 |
| GenoType MTBC (набор для анализа 12 образцов) | 301 |
| GenoType MTBC (набор для анализа 96 образцов) | 30196 |
| GenoType NTM-DR (набор для анализа 12 образцов) | 29712 |
| GenoType NTM-DR (набор для анализа 96 образцов) | 29796 |

Технические характеристики

Для оценки технических характеристик набора **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 тестирование проводили, как описано в инструкции по использованию.

Диагностическая характеристика

Диагностические технические характеристики набора **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 были определены на 114 культивированных образцах. Набор **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 сравнивали с культурой (успешное культивирование на плотной среде Loewenstein-Jensen или в MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA) и последующей идентификацией видов на наборе **GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0). Экстракцию ДНК выполняли на наборе **GenoLyse®** в соответствии с инструкцией для использования.

Результаты тестирования декларировались, как истинно положительные, если результаты, полученные на **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 совпадали с результатами культуры/**GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0.

Таблица 1: Технические характеристики набора **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 для выявления микобактерий из культурального материала сравнивали с культурой/**GenoType Mycobacterium CM** VER 1.0 (GT Мусо CM V1)

| GenoType
Mycobacterium CM
VER 2.0 | Культура/GT Мусо CM V1 | | | Диагностическая чувствительность : 100%
Диагностическая специфичность :100%
Предективное положительное значение : 100%
Предективное орицательное значение : 100% |
|---|------------------------|-------------------|---------------|---|
| | положительный | | отрицательный | |
| | положительный | 105 ¹⁾ | 0 | |
| | отрицательный | 0 | 9 | |

¹⁾ 105 образцов были идентифицированы как 7х комплекс *M. abscessus*, 15х *M. avium*, 6х грппна *M. fortuitum* (*M. fortuitum*), 8х *M. gordonae*, 16х *M. intracellulare*, 6х *M. kansasii*, 6х *M. malmoense*, 5х *M. marinum*/*M. ulcerans*, 2х *M. scrofulaceum*, 1х комплекс *M. tuberculosis*, 5х *M. xenopi*, 5х *M. chelonae* и 23х *Mycobacterium* спец.

Аналитические характеристики

Аналитическая специфичность

Специфичность набора **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 обеспечивается благодаря чёткой разработке специфических праймеров и зондов, которые в частности считаются, гомологичными при сравнении последовательностей, опубликованных в генетической базе данных, и подвергаются жёстким условиям реакции.

Аналитическая специфичность набора **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 была определена на всех штаммах микобактерий, идентифицируемых этим тестом, а так же на штаммах микобактериальных и не-микобактериальных видов, которые не улавливаются этой тест-системой.

Все микобактерии, идентифицируемые этим исследованием, генерировали корректные специфические полоски. Изоляты видов микобактерий, не идентифицируемые тест-системой и все протестированные не-микобактериальные виды не отобразили специфических полос. Таким образом, аналитическая специфичность для специфичных проб на стрипах **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 оказалась 100%.

Те же образцы были так же оценены на Родо-специфичные пробы - Genus-specific probe (GC). В этих пробах выявленная аналитическая специфичность составила 98.6%.

Штаммы всех микобактерий, идентифицируемых набором **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 были протестированы:

| | | | |
|----------------------------|------------------------|---|--|
| <i>M. avium</i> | <i>M. szulgai</i> | Комплекс <i>M. abscessus</i> | Комплекс <i>M. tuberculosis</i> |
| <i>M. chelonae</i> | <i>M. kansasii</i> | (<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> , | (<i>M. tuberculosis</i> , |
| <i>M. immunogenum</i> | <i>M. malmoense</i> | <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> , | <i>M. bovis</i> subsp. <i>bovis</i> , |
| <i>M. mageritense</i> | <i>M. haemophilum</i> | <i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>) | <i>M. bovis</i> subsp. <i>caprae</i> , |
| <i>M. gordonae</i> | <i>M. marseillense</i> | | <i>M. bovis</i> BCG, |
| <i>M. intracellulare</i> | <i>M. palustre</i> | Группа <i>M. fortuitum</i> | <i>M. africanum</i> , |
| <i>M. chimera</i> | <i>M. nebraskense</i> | (<i>M. fortuitum</i> , | <i>M. microti</i> , |
| <i>M. scrofulaceum</i> | <i>M. marinum</i> | <i>M. peregrinum</i> , | <i>M. canettii</i> , |
| <i>M. parascrofulaceum</i> | <i>M. ulcerans</i> | <i>M. alvei</i> , | <i>M. pinnipedii</i>) |
| <i>M. paraffinicum</i> | <i>M. xenopi</i> | <i>M. septicum</i>) | |
| <i>M. interjectum</i> | | | |

Протестированные виды микобактерий, не выявляемые на наборе **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0:

| | | | |
|---------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------|
| <i>M. asiaticum</i> | <i>M. goodii</i> | <i>M. mucogenicum</i> | <i>M. simiae</i> |
| <i>M. celatum</i> | <i>M. heckeshornense</i> | <i>M. phlei</i> | <i>M. smegmatis</i> |
| <i>M. gastri</i> | <i>M. intermedium</i> | <i>M. shimoidei</i> | <i>M. triple</i>) |
| <i>M. genavense</i> | <i>M. lentiflavum</i> | | |

Протестированные не-микобактериальные виды, не выявляемые на наборе **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0:

| | | | |
|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Bordetella pertussis</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| <i>Corynebacterium ulcerans</i> | <i>Nocardia amarae</i> | <i>Rhodococcus erythropolis</i> | <i>Streptomyces somaliensis</i> |
| <i>Corynebacterium xerosis</i> | <i>Nocardia asteroides</i> | <i>Rhodococcus rhodochrous</i> | <i>Tsukamurella inchoensis</i> |
| <i>Escherichia coli</i> | <i>Nocardia farcinica</i> | <i>Rhodococcus ruber</i> | <i>Tsukamurella paurometabola</i> |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | <i>Nocardia otidiscaviarum</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Tsukamurella pulmonis</i>) |

Аналитическая чувствительность (Предел детекции. LOD)

Для определения аналитической чувствительности набора **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 для культурального материала, четыре разведения культуры BCG (1,65х 10⁶, 1,65х 10⁵, 1,65х 10⁴ и 1,65х 10³ КОЕ/мл) были поставлены в трёх повторностях. Включая отрицательный контроль, ДНК выделяли с использованием набора **GenoLyse®** и анализировали на наборе **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0, соблюдая протокол ПЦР "MDR CUL". Предел выявления составил 1,65х 10⁵ КОЕ/мл.

Воспроизводимость

Точность интра-анализа и точность интер-анализа была определена на следующих четырёх образцах:

- Разведения культуры BCG выше предела детекции
- Разведения культуры BCG на пределе детекции
- Образцы, положительные на содержание ДНК *Bordetella pertussis*
- Отрицательный контроль

Экстракцию ДНК проводили с использованием набора **GenoLyse®**, а изоляты тестировали на наборе **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 следуя протоколу ПЦР “MDR CUL”.

Чтобы определить точность интра-анализа, образцы были проверены в четырёх параллелях при идентичных условиях (та же серия наборов, тот же аппарат, тот же оператор, то же время отсчёта и т.д.) за один прогон ПЦР. Во всех параллелях продемонстрированы идентичные и правильные результаты и сравнимая интенсивность сигнала. Таким образом, достигнутая точность интра-анализа составила 100%.

Чтобы определить точность интер-анализа, образцы были протестированы в течение трёх разных дней. Другие условия эксперимента (серия набора, аппарат, оператор и т.д.) были идентичными. Во всех параллелях показаны идентичные и правильные результаты и сравнимые интенсивности сигнала. Таким образом, достигнутая точность интер-анализа составила 100%.

Интерферирующие вещества

Есть вещества, которые могут ингибировать ПЦР реакции. Такие ингибиторы, к примеру, могут попасть из культуральной среды. Для того чтобы определиться, не влияет ли среда на **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0, шесть разных штаммов комплекса *M. tuberculosis* были культивированы на четырёх разных средах (плотных средах: Loewenstein-Jensen, Stonebrink, и Middlebrook-7H10, жидкая среда: MGIT (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA)). ДНК была экстрагирована на наборе **GenoLyse®**, а изоляты были протестированы на наборе **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0 с применением ПЦР протокола “MDR CUL”.

Все образцы продемонстрировали правильные результаты на всех проверенных средах. Таким образом, можно исключить, что из проверенных сред попадают ингибиторы при тестировании на **GenoType Mycobacterium CM** VER 2.0.

Стабильность

Срок годности тестового набора при рекомендуемых условиях хранения указан на упаковке.

Стабильность определялась согласно требованиям DIN EN ISO 23640.

Список литературы

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. World Health Organization, Geneva, Switzerland 2020.
2. Falkinham JO 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 177-215.
3. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th edition. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA 2009.
4. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards), USA, Document M29 (please refer to the latest version).

Важные изменения в инструкции IFU-299A-03

| Глава | Изменения |
|--|---|
| Реагенты и инструменты | Прежние разделы «Состав набора», «Хранение и утилизация компонентов набора», «Меры предосторожности при работе с компонентами набора» и «Необходимые, но не поставляемые материалы» теперь являются подразделами раздела «Реагенты и инструменты». |
| Меры предосторожности при работе с компонентами набора | Для получения дополнительной информации об опасных веществах в составе комплекта, пожалуйста, обратитесь к материалам по безопасности работы, которые можно загрузить с сайта: www.hain-lifescience.com/products/msds.html |
| Требования к образцу | Глава «Требования к образцу» была переименована (Это изменение касается только следующих инструкций по использованию на иностранном языке: английском).
Новое: «Со всеми культуральными образцами, которые могут содержать микобактерии, следует обращаться, применяя методики Biosafety Level 2 или, если это указано, методики Biosafety Level 3 (например, см. [3]). Необходимо соблюдать все принятые на федеральном, региональном (на уровне штата) и местном уровне законы по безопасности труда.»
Новое: «Транспортировка, хранение и подготовка образцов пациентов и культуральных образцов должны осуществляться в соответствии с местными, национальными и/или международными правилами и стандартами, действующими в лаборатории.» |



Hain Lifescience GmbH

Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany
www.hain-lifescience.de, +49 (0) 74 73- 94 51- 0