

**Onar®Ct**  
**Chlamydia trachomatis Diagnosis Kit for qPCR**  
**- Type 1 and Type 2 -**

**Inhaltsverzeichnis**

1. Produkthinweise	2
1.1 Enthaltene Reagenzien	2
1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien	2
1.3 Benötigte Materialien	2
2. Anwendungsgebiete und Testprinzip	3
3. Durchführung	3
3.1 Probenentnahme und Lagerung	3
3.2 Aufbereitung des Probenmaterials	5
3.3 Rehydratisierung der Reagenzien	5
3.4 Programmierung und Auswertung	6
3.4.1 LightCycler® 1.2, 1.5 und 2.0 (für Kits vom Typ 1)	6
3.4.2 Rotorgene 6000 (5-plex) (für Kits vom Typ 1)	7
3.4.3 ABI 7500 (für Kits vom Typ 2)	8
3.5 Ansatz des PCR-Reaktionsmixes (Mastermix)	9
3.6 Interpretation der Ergebnisse	9
4. Fehleranalyse	10
5. Leistungsdaten	11

**Contents**

1. General Advice	13
1.1 Test Kit Components	13
1.2 Stability and Storage	13
1.3 Supplemental Requirements	13
2. Application and Test Principle	14
3. Test Protocol	14
3.1 Specimen Collection and Sample Storage	14
3.2 Preparation of Sample Material	16
3.3 Rehydration of the Reagents	16
3.4 Experimental Protocol and Result Reading	17
3.4.1 LightCycler® 1.2, 1.5 and 2.0 (for type 1 kits)	17
3.4.2 Rotorgene 6000 (5-plex) (for type 1 kits)	18
3.4.3 ABI 7500 (for type 2 kits)	19
3.5 PCR Master Mix Setup	20
3.6 Result Interpretation	20
4. Trouble Shooting	21
5. Performance Data	22

# 1. Produkthinweise

**Bitte verwenden Sie das Produkt und Einzelkomponenten nicht mehr nach Ablauf der Haltbarkeit. Verwerfen Sie bitte überschüssige Einzelkomponenten.**

## 1.1 Enthaltene Reagenzien

<i>Primer/Probe/Nucleotide Mix (PPN-Mix)</i> , nur Typ 1 Primer, Sonden und Desoxynukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dUTP, portioniert für 25 Tests, lyophilisiert	roter Verschluss
<i>Primer/Probe/Nucleotide Mix (PPN-Mix)</i> , nur Typ 2 Primer, Sonden und Desoxynukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dUTP, portioniert für 25 Tests, lyophilisiert.	oranger Verschluss
<i>Rehydration Buffer</i> 1,8 ml	blauer Verschluss
<i>Positive Control DNA</i> DNA-Fragmente des Genoms von <i>Chlamydia trachomatis</i> , mittels PCR hergestellt, nicht infektiös, lyophilisiert	grüner Verschluss
<i>Internal Control DNA</i> Interne Kontrolle, Plasmid-DNA, lyophilisiert	gelber Verschluss
<i>PCR grade Water</i> 2 ml	weißer Verschluss
<i>MB DNA Polymerase</i> 1 Unit/ $\mu$ l	brauner Verschluss

## 1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Alle Reagenzien werden auf Coolpacks versendet und müssen bei +2 °C bis +8 °C gelagert werden. Die MB Taq DNA Polymerase nach Erhalt der Ware sofort entnehmen und bei – 20 °C lagern. Der *Primer/Probe/Nucleotide Mix* ist lichtgeschützt aufzubewahren. Nach Rehydratisierung der lyophilisierten Komponenten sollte häufiges Auftauen und Einfrieren der Reagenzien vermieden werden. Werden wenige Proben regelmäßig getestet, sollten die Kontrollen und der *Primer/Probe/Nucleotide Mix* aliquotiert und eingefroren werden. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung ist der Kit bis zu dem im Produktzertifikat (das Produktzertifikat finden Sie auf unserer Webseite) angegebenen Datum haltbar.

## 1.3 Benötigte Geräte und Materialien

- qPCR-Gerät
- geeignete PCR-Reaktionsgefäße
- Mikrozentrifuge, Mikroliterpipetten und Filterspitzen (1 - 1000  $\mu$ l)

## 2. Anwendungsgebiete und Testprinzip

Onar®Ct ist ein *in vitro* Testsystem zur qualitativen Diagnostik von *Chlamydia trachomatis* in klinischen Proben. Der Test basiert auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion. Der direkte Nachweis von *Chlamydia trachomatis* ist innerhalb von 2-3 Stunden möglich. Die mitgelieferten Primer sind für das chromosomale *momp*-Gen (*major outer membrane protein*) von *Chlamydia trachomatis* spezifisch. Das Genom von *Chlamydia trachomatis* enthält nur eine Kopie des *momp*-Gens. Im Gegensatz zu Testverfahren die das *cryptic plasmid* zur Erreichung der notwendigen Sensitivität amplifizieren, ist mit dem Onar®Ct eine orientierende Quantifizierung der Erregerlast in der Probe möglich. Das Testergebnis ist dadurch für die klinische Bewertung aussagekräftiger und Infektionsverläufe besser verfolgbar. Innerhalb des amplifizierten Produktes bindet eine spezifische Sonde, deren Fluoreszenzsignal bei ~ 520 nm (Typ 1 und Typ 2) die Bildung des Produktes anzeigt. Das Testsystem beinhaltet außerdem eine Interne Kontrolle, die im PCR-Ansatz mitgeführt werden kann. Die interne Kontrolle liefert bei einer erfolgreichen PCR ein Produkt, das mit einer weiteren sequenzspezifischen Sonde bei ~ 610 nm (Typ 1) und bei ~ 560 nm (Typ 2) detektiert wird. Dadurch können falsch-negative Ergebnisse, z.B. durch Inhibition ausgeschlossen werden. Der *Primer/Probe/Nucleotide Mix* enthält serienmäßig dUTP statt dTTP. Durch die Verwendung des hitzelabilen Enzyms Uracil-DNA Glycosylase (UNG) im PCR-Ansatz kann ein Verschleppen früherer PCR-Produkte in den neuen Reaktionsansatz vermieden werden. UNG ist nicht Bestandteil von Onar®Ct.

## 3. Durchführung

### 3.1 Probenentnahme und Lagerung

#### Abnahmeinweise:

#### 1. Urin

Erststrahlurin

Dieses Material wird vom Gemeinsamen Bundesausschuss für das Screening in der Schwangerschaft, das jährliche Screening von Frauen unter 25 Jahren sowie vor Schwangerschaftsabbruch empfohlen. Ungeeignet sind Mittelstrahl – und Katheterurin.

- Der Patient darf in den 2 vorangehenden Stunden nicht uriniert haben.
- Die ersten 10 ml in einem sauberen Polypropylenbehälter ohne Konservierungsstoffe auffangen.
- Urinproben sind bei Raumtemperatur (19 - 23 °C) für 24 Stunden haltbar. Proben die nicht innerhalb dieser Zeit aufbereitet werden können, müssen bei 2 - 8 °C gelagert und innerhalb von 7 Tagen nach Entnahme verarbeitet werden. Längere Lagerung sollte dann bei < - 20 °C erfolgen (max. 30 Tage).

#### 2. Ejakulate:

- Nur Probenbehälter ohne Konservierungsstoffe verwenden!
- Ejakulatproben sollten nach Abnahme noch am gleichen Tag (bei 2 - 8 °C) ins Labor geschickt und aufbereitet werden.
- Sollte die DNA Isolierung und Analyse der Proben nicht sofort erfolgen, empfiehlt sich eine Lagerungsdauer von maximal 30 Tagen bei < - 20 °C.

### 3. Abstrichproben

Für die Sammlung von Augen- , Endozervikal- und Urethralabstriche hat sich die Verwendung von trocknen Tupfern wie z.B. Darcon® oder Kunstfaser bewährt:

- ⇒ MASTASWAB (Mast Diagnostica) Bestell-Nr. 800108 MD 508
- ⇒ Sterile Swab Applicators (mico Rheologics/Copan) Bestell-Nr. 502CS01\*
- ⇒ Flocked swabs (microRheologics/COPAN) Bestell-Nr. 552C nylon\*
- ⇒ Forensische Tupfer DNA Flocked Swab (Copan) Bestell-Nr. 3520CS01-4N6 \*

\*Vertrieb über Mast Diagnostica GmbH, Deutschland

#### Endozervikalproben

- Vor Abnahme der Probe sollte zunächst der aufgelagerter Schleim von der Exozervix entfernt werden.
- Anschließend den Tupfer in den Endozervixkanal einführen.
- 3 - 5 Sekunden über die gesamte Oberfläche drehen und herausziehen. Den Kontakt mit der Vaginalwand vermeiden!
- Die Proben sollten innerhalb von 7 Tagen verarbeitet werden, erfolgt die Untersuchungen der Probe erst nach 7 Tagen empfiehlt sich die Lagerung bei - 20°C.

#### Urethralproben

- Das Urinieren während 1 Stunde vor der Probenentnahme vermeiden.
- Den Tupfer 2 - 4 cm in die Harnröhre einführen, etwa 3 - 5 Sekunden unter leichtem Druck drehen und herausziehen.
- Die Proben sollten innerhalb von 7 Tagen verarbeitet werden, erfolgt die Untersuchungen der Probe erst nach 7 Tagen empfiehlt sich die Lagerung bei - 20°C.

### 3.2 Aufbereitung des Probenmaterials

Zum Direktnachweis von *Chlamydia trachomatis* eignet sich Urin als Untersuchungsmaterial hervorragend. Zur Probenvorbereitung ist grundsätzlich eine DNA-Extraktion mit einem handelsüblichen DNA-Extraktionskit, wie dem Minerva Biolabs DNA Extraction Kit (Cat # 56-1100) angeraten. Dabei werden Inhibitoren der PCR sicher entfernt und zudem wird eine Konzentrierung der *Chlamydia trachomatis*-DNA erreicht. Der enthaltene DNA-Extrakt kann direkt für den Onar<sup>®</sup>Ct eingesetzt werden.

Für eine manuelle Probenvorbereitung hat sich folgendes Protokoll bewährt:

1. 1 ml Urin oder Transportmedium bei 18.000 x g für 20 min zentrifugieren
2. Den Überstand vorsichtig abnehmen
3. Das Pellet mit 500 µl 1x PBS waschen und erneut bei 18.000 x g für 20 min zentrifugieren
4. Den Überstand vorsichtig abnehmen
5. Das Pellet in 25 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,2 resuspendieren
6. 2,5 µl Proteinase K (1 mg/ml) zugeben und für 30 min bei 56 °C inkubieren
7. Anschließend Inaktivierung für 10 min bei 95 °C
8. Das Lysat kurz anzentrifugieren und vom Überstand direkt 10 µl in die PCR einsetzen
9. Die Lysate anschließend bei < -20°C lagern.



**Bei der Verwendung von Extraktionskits anderer Hersteller oder Anwendung eigener Verfahren ist darauf zu achten, dass die aufgereinigte DNA in Wasser oder 10 mM Tris-HCl aufgenommen wird. Elutionspuffer anderer Hersteller können zu einer Inhibition der PCR führen.**

Eine Lagerung der Extrakte bei mindestens -18°C über einen Zeitraum von einem Jahr ist möglich. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen oder eine Lagerung im Kühlschrank für mehr als 12 Stunden sollte vermieden werden. Die hohe Empfindlichkeit der PCR-Methode erhöht die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse, z.B. durch Kreuzkontaminationen oder unsauberes Arbeiten. Alle Arbeiten sollten unter Beachtung der geltenden Laborregeln durchgeführt werden.

### 3.3 Rehydratisierung der Reagenzien

1. Lyophilisate für 5 Sekunden bei max. Umdrehung in der Tischzentrifuge zentrifugieren
2. Zugabe von 365 µl *Rehydration Buffer* zum *Primer/Probe/Nucleotide Mix*
3. Zugabe von 300 µl *PCR grade Water* zur *Internal Control DNA* und zur *Positive Control DNA*
3. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
4. Anschließend kurz vortexen und für wenige Sekunden zentrifugieren

### 3.4 Programmierung und Auswertung

Programme für weitere real-time PCR-Geräte werden auf unser Homepage angeboten.

#### 3.4.1 LightCycler® 1.2, 1.5 und 2.0 für Kits vom Typ 1

##### Programmschritt 1: Vorinkubation

Zyklen 1  
Analysemodus None

##### **Temperaturprofil [°C] Segment 1**

Zieltemperatur [°C] 95  
Inkubationszeit [min] 2:00  
4 Temperaturanstiegsrate [°C/s] 20.0  
zweite Zieltemperatur [°C] 0  
Temperaturschritte [°C] 0.0  
Verzögerung [Zyklen] 0  
Fluoreszenzmessung None



##### **LightCycler® 2.0:**

**Bitte achten Sie bei der Programmierung auf die Einstellung der „Seek Temperature“, diese sollte auf mindestens 90 °C eingestellt sein.**

##### Programmschritt 2: Amplifikation

Zyklen 45  
Analysemodus Quantifikation

##### **Temperaturprofil [°C] Segment 1 Segment 2 Segment 3 Segment 4**

Zieltemperatur [°C]	95	55	60	72
Inkubationszeit [s]	0	5	7	5
Temperaturanstiegsrate [°C/s]	20.0	20.0	20.0	20.0
zweite Zieltemperatur [°C]	0	0	0	0
Temperaturschritte [°C]	0.0	0.0	0.0	0.0
Verzögerung [Zyklen]	0	0	0	0
Fluoreszenzmessung	None	None	Single	None



**Segment 3 darf nicht weggelassen werden!**

##### Programmschritt 3: Kühlung

Zyklen 1  
Analysemodus None

##### **Temperaturprofil [°C] Segment 1**

Zieltemperatur [°C] 40  
Inkubationszeit [s] 30  
Temperaturanstiegsrate [°C/s] 20.0  
zweite Zieltemperatur [°C] 0  
Temperaturschritte [°C] 0.0  
Verzögerung [Zyklen] 0  
Fluoreszenzmessung None

### Auswertung der Rohdaten:

- Es erfolgt zunächst die Auswahl der Fluoreszenzkanäle F1 und F2 bzw. Channel 1 und 3.
- Zu Darstellung der Amplifikationskurven und den probenspezifischen *ct*-Werten wird auf *Quantification* geklickt.
- Der Threshold wird von der Software automatisch gelegt.
- Amplifikationskurven ohne signifikanten Anstieg sind als negativ zu werten.

Target	<b>Ct-momp</b>	<b>Interne Kontrolle</b>
Kanäle beim LC 1.2, 1.5	F1 (530)	F2 (640)
Kanäle bei LC 2.0	Channel 1 (530)	Channel 3 (610)

### 3.4.2 Rotorgene 6000 (5-plex) für Kits vom Typ 1

#### Programmschritt 1: Vorinkubation

Einstellung	Hold
Zieltemperatur	95 °C
Inkubationszeit	3:00 min



**Bitte achten Sie vor dem Start des Laufes auf die korrekte Filterauswahl:**

**Target (Ct-momp): Green (470-510 nm)**

**Interne Kontrolle: Orange (585-610 nm)**

#### Programmschritt 2: Amplifikation

Einstellung	Cycling
Zyklen	45
Denaturierung	95 °C für 5 sek
Annealing	55 °C für 10 sek —> <b>Datenerfassung (Filter Green und Orange)</b>
Extension	72°C für 7 sek
Gain	automatisch (auto Gain)
Slope Correct	aktiviert
Ignore First	deaktiviert

### Auswertung der Rohdaten:

- Öffnen des Fensters *Analysis*
- Auswahl des Reiters *Quantitation*
- Auswahl des jeweiligen Kanals (Green oder Orange)
- Starten der Analyse durch doppeltes Anklicken.
- Es öffnen sich folgende Fenster:
  - Quantitation Analysis - Cycling A* (green oder orange)
  - Quant. Results - Cycling A* (green oder orange)
  - Standard Curve - Cycling A* (green oder orange)
- Im Fenster *Quantitation Analysis* erst *linear scale* und dann *slope correct* wählen
- Einstellung des Threshold (entfällt wenn eine Standardreihe mitgeführt und *Autothreshold* angewählt wurde)
  - Im Fenster *CT Calculation* den Threshold setzen (Wert 0-1)
  - Thresholdlinie in Grafik platzieren. Die Thresholdlinie sollte an den Anfang des linearen Bereichs der Positivkontrolle gelegt werden.
- Im Fenster *Quant. Results* können die *ct*-Werte abgelesen werden.
- Proben, die keine *ct*-Werte zeigen sind als negativ zu werten.

Target	<b>Ct-momp</b>	<b>Interne Kontrolle</b>
Kanal	Green	Orange

### 3.4.3 ABI 7500 für Kits vom Typ 2

#### Programmschritt 1: Vorinkubation

Einstellung                    Hold  
Zieltemperatur                95 °C  
Inkubationszeit               3:00 min

#### Programmschritt 2: Amplifikation

Zyklen                         45  
Einstellung                    Cycle  
Denaturierung                95 °C für 30 sek  
Annealing                     55 °C für 30 sek  
Extension                      60 °C für 45 sek



**Bitte achten Sie vor dem Start des Laufes auf die korrekte Filterauswahl!**

**Target (Chl. tr.):        FAM**

**Interne Kontrolle:    VIC**

**Quencher:                none**

**Die ROX-Referenz-Funktion muss ausgeschaltet sein. Beide Detektoren müssen für jedes verwendete Reaktionsgefäß aktiviert werden. Fluoreszenzmessung während der Extension.**

#### **Auswertung der Rohdaten:**

- Die Grundeinstellungen erfolgen in der rechten Funktionsleiste:

Data:            Delta RN vs. Cycle

Detector:        FAM und VIC

Line Color:     Well Color

Target	<b>Chl. trachomatis</b>	<b>Interne Kontrolle</b>
Kanal	FAM	VIC

- Mit der rechten Maustaste öffnet sich ein neues Fenster, dort erfolgt die Einstellung der *Graph settings*

Folgende Einstellungen sollten dort angewählt und im Anschluß mit *ok* bestätigt werden:

Real Time Settings:            Linear

Y-Axis Post Run Settings:     Linear und Auto Scale

X-Axis Post Run Settings:     Auto Scale

Display Options:                2

- Zur Berechnung der *ct*-Werte und deren Darstellung im Report bitte auf *Analyze* klicken. Der Threshold sollte an den Anfang des linearen Bereichs der Positivkontrolle

### 3.5 Ansatz des PCR-Reaktionsmixes (Mastermix)

Das Gesamtvolumen des Ansatzes für eine Reaktion beträgt 25  $\mu\text{l}$ . Für jede Testreihe muss eine Negativkontrolle (NK) und eine Positivkontrolle (PK) mitgeführt werden. Der Mastermix wird in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß angesetzt und vorsichtig gemischt.

	für 1 Reaktion	für 25 Reaktionen*
<i>Primer/Probe/Nucleotide Mix</i>	14,0 $\mu\text{l}$	350,0 $\mu\text{l}$
<i>Internal Control DNA</i>	1,0 $\mu\text{l}$	25,0 $\mu\text{l}$
<i>MB DNA Polymerase</i>	1,0 $\mu\text{l}$	25,0 $\mu\text{l}$
gesamt	16,0 $\mu\text{l}$	

\*entspricht dem Inhalt eines *Primer/Probe/Nucleotide Mix*-Röhrchens



**Zwischen der Herstellung des Mastermixes und dem Starten der PCR dürfen nicht mehr als 45 Minuten vergehen, da es sonst zu einer Verringerung der Fluoreszenzausbeute kommt.**

Der Mastermix wird á 15  $\mu\text{l}$  auf die PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Der Überschuss (1  $\mu\text{l}$ ) an Mastermix wird verworfen.

Den einzelnen PCR-Gefäßen wird entweder als Negativkontrolle 10  $\mu\text{l}$  PCR-Wasser oder der Elutionspuffer der DNA-Extraktion bzw. 10  $\mu\text{l}$  Probe bzw. 10  $\mu\text{l}$  Positivkontrolle hinzugefügt. Diese Pipettierreihenfolge sollte eingehalten und die Reaktionsgefäße nach jedem Pipettieren sofort geschlossen werden. Der Ansatz wird kurz zentrifugiert, die Reaktionsgefäße in den Thermocycler gestellt und das Thermocycler-Programm gestartet.

### 3.6 Interpretation der Ergebnisse

Die Präsenz von *C. trachomatis* in der Probe wird durch einen Anstieg des Fluoreszenzsignals für *Ct-momp* angezeigt. Bei Verwendung der Internen Kontrolle wird eine fehlerfreie PCR durch einen Anstieg des Fluoreszenzsignals im Kanal für die Interne Kontrolle angezeigt. Die Interne Kontrolle ist so gering dosiert, dass sie bei großen Mengen an *C. trachomatis* in der Probe nicht mehr amplifiziert wird. Eine erfolgreiche PCR ist dann durch das Signal im Kanal für *Ct-momp* erkennbar.

<b>Ct-momp PCR</b>	<b>Interne Kontrolle</b>	<b>Interpretation</b>
positiv	irrelevant	<i>Chlamydia trachomatis</i> positiv
negativ	negativ	Inhibition der PCR
negativ	positiv	<i>Chlamydia trachomatis</i> negativ

## 4. Fehleranalyse

Zur Fehleranalyse sollten zuerst das Thermocycler-Programm sowie eventuelle Pipettierfehler überprüft werden. Anschließend empfiehlt sich die Durchführung von Probeläufen mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle.

Findet bei den Kontrollansätzen keine Amplifikation statt, kann dies folgende Ursachen haben:

- Pipettierfehler (siehe 3.5 Ansatz des PCR-Reaktionsmixes)
- Programmierfehler, z.B. aufgrund falscher Einstellung der Fluoreszenzkanäle
- Probenelutionspuffer nicht für die Komplettierung der Negativkontrollen verwendet

## 5. Leistungsdaten

Leistungsparameter	Leistungsdaten
Analytische Sensitivität (p=0,05) ohne Berücksichtigung der Probenaufbereitung	2,4 GE/ $\mu$ l, entspricht 0,9 IFU/ $\mu$ l
Analytische Sensitivität unter Berücksichtigung der Probenaufbereitung	8,1 GE/ $\mu$ l, entspricht 2,5 IFU/ $\mu$ l
Analytische Spezifität	100 % für die Serovare A - K und L1 - L3 Keine Kreuzreaktivität mit relevanten Kommensalkleimen
Diagnostische Sensitivität Urine: n = 61 Ejakulate: n = 21 Abstriche: n = 61	Urine: 93,6 % Ejakulate: 100 % Abstriche: 100 %
Diagnostische Spezifität (n=143 klinische Proben)	100 %
Präzision (Intraassay)	4 % bei 2000 GE/PCR
Präzision (Interassay)	6 % bei 2000 GE/PCR
Robustheit	Verschleppung: 0 % Ausfallrate des Systems: 0 % Matrixeffekte: 0 %
Sonstige Parameter	Chargenvarianz: 0,9 % Linearität: 200 bis $2,0 \times 10^7$ GE/PCR Pipettierzeiten: < 60 Minuten ohne Einfluss Ringversuch: Instand RV531 korrekt analysiert

# 1. Reagents and Materials

**Please do not use the product after the date of expiry. Discard remaining reagents.**

## 1.1 Test Kit Components

<i>Primer/Probe/Nucleotide Mix (PPN Mix)</i> , with type 1 kits only Primer set, probes and deoxynucleotide triphosphates dATP, dCTP, dGTP and dUTP, aliquoted for 25 reactions, lyophilized	red cap
<i>Primer/Probe/Nucleotide Mix (PPN Mix)</i> , with type 2 kits only Primer set, probes and deoxynucleotide triphosphates dATP, dCTP, dGTP and dUTP, aliquoted for 25 reactions, lyophilized	orange cap
<i>Rehydration Buffer</i> 1.8 ml	blue cap
<i>Positive Control DNA</i> Fragment of <i>Chlamydia trachomatis</i> DNA, non-infectious, lyophilized	green cap
<i>Internal Control DNA</i> Plasmid DNA, non-infectious, lyophilized	yellow cap
<i>PCR grade Water</i> 2 ml	white cap
<i>MB Taq DNA Polymerase</i> 1 U/ $\mu$ l	brown cap

## 1.2 Stability and Storage

Kit components are stable during shipping. Upon receipt, store at +2 °C to +8 °C. After receive the product take immediately the polymerase and store below – 20 °C. After rehydration of the *Primer/Probe/Nucleotide Mix* store below -18 °C and avoid repeated freezing and thawing. Protect the *Primer/Probe/Nucleotide Mix* from light. For repeated testing of low sample numbers, the *Primer/Probe/Nucleotide Mix* and the controls should be aliquoted. By following these recommendations, the kit is stable until the expiration date stated on the box label.

## 1.3 Supplemental Requirements

- qPCR machine
- corresponding PCR reaction tubes
- micro centrifuge, micropipettes and filtered tips (1 - 1000  $\mu$ l)

## 2. Application and Test Principle

Onar<sup>®</sup>Ct is an *in vitro* test for qualitative and semi-quantitative PCR-based diagnostics of *Chlamydia trachomatis* in clinical samples. The detection procedure can be performed within 2 to 3 hours. The primer set and probe are specific for a segment of the chromosomal *momp* gene (*major outer-membrane protein*). The genome of *Chlamydia trachomatis* contains only one copy of the *momp* gene locus. In contrast to other test methods amplifying the multicopy *cryptic plasmid*, Onar<sup>®</sup>Ct allows the relative quantification of the pathogen for significant clinical valuation and infection process monitoring.

The target probe emits fluorescent light at ~520 nm (type 1 and type 2). Onar<sup>®</sup>Ct also provides internal control DNA, which can be added to the reaction. When running the PCR with the internal control DNA, a successful performed reaction with a negative result is indicated by a distinct fluorescent signal. The internal control is detected by another probe, which emits light at ~610 nm (Type 1) and ~ 560 nm (Type 2).

Onar<sup>®</sup>Ct contains the nucleotide dUTP instead of dTTP. The heat-labile Uracil-DNA Glycosylase (UNG) is suitable to prevent carry-over contamination between PCRs. This technique relies on the incorporation of deoxyuridine triphosphate (dUTP) during all amplified reactions and the pretreatment of all successive PCR mixtures with the heat-labile UNG. UNG is not provided with Onar<sup>®</sup>Ct.

## 3. Test Protocol

### 3.1 Specimen Collection and Sample Storage

#### 1. Urine Specimens

- The patient should be advised not to urinate for at least two hours prior to specimen collection
- Collect 10 ml of first-catch urine in a clean container of polypropylene without preservatives.
- The urine specimens may be stored at room temperature (19 - 23 °C) if testing of samples can be completed within 24 hours.
- Samples have to be stored at 2 - 8 °C in the fridge, if the testing is done within 7 days.
- Stored at < - 20 °C for up to 30 days.

#### 2. Ejaculate Specimens

- The ejaculates must be collected the same day to be going to be shipped to the laboratory.
- Sample must be stored at < - 20 °C
- If a ejaculates cannot be processed directly after receipt in the laboratory, it must be stored at < - 20 °C and tested within 30 days.

### 3. Swab Specimens

- Samples must be shipped refrigerated.
- If the swab specimens are not processed directly after receipt in the laboratory, they have to be stored at 2 - 8 °C and have to be processed within seven days. If they are not tested within seven days after collection, the samples have to be stored at < -20 °C and tested within up to 30 days.

For the collection of eye, end cervical and urethral swabs, please use Darcon® or rayon swabs:

- ⇒ MASTASWAB, MAST DIAGNOSTICA, Cat. No. 800108 MD 508
- ⇒ Sterile Swab Applicators, micro Rheologics/Copan, Cat. No. 502CS01
- ⇒ Forensic swabs predetermined break zone, sterile wrapped, Copan, Cat. No. 3520CS01-4N6
- ⇒ Flocked swabs, microRheologics/Copan, Cat. No. 552C nylon

### 3.2 Preparation of Sample Material

Clinical samples should be extracted from infected or routine-screening patients. This diagnostic assay can be performed with various specimens, especially urine. It is necessary that templates for PCR analysis are prepared by DNA extraction using a suitable DNA extraction kit. The kit was validated using Minerva Biolabs DNA Extraction Kit (Cat. No. 56-1100) with urine and pool urine.

Alternatively, the following manual protocol has been proved of value and used for determination of analytical sensitivity:

1. centrifuge 1 ml urine or 1 ml transport medium (swabs) at 18.000 x g for 20 min.
2. removed supernatant
3. washed sediment in 500  $\mu$ l 1 x PBS pH 7.3 (phosphate-buffered saline)
4. centrifuge (18.000 x g for 20 min) and resuspend the sediment in 25  $\mu$ l 10 mM Tris-HCl, pH 7.2
5. add 2,5  $\mu$ l proteinase K (1 mg/ml) and incubate at 56 °C for 30 min
6. incubate at 95 °C for 10 min to lyse the cells and inactivate the proteinase K
7. after a short centrifugation, the sample is ready to us for PCR
8. if not tested immediately, samples are stored at -20 °C.



**Using extraction kits from other manufacturers please note that the extract must be eluted in water or 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. Elution buffers provided with the extraction kits from other manufacturers may cause inhibition of the PCR.**

10  $\mu$ l of the DNA extract can be used directly as PCR template. The extracts can be stored at a temperature of below -20 °C for a period of one year. Repeated freezing and thawing or storage in the refrigerator for more than 12 hours should be avoided. The sample should not contain more than 100  $\mu$ g/ml DNA.

### 3.3 Rehydration of the Reagents

1. centrifuge tubes with lyophilized components (5 sec at maximum speed)
2. add 365  $\mu$ l *Rehydration Buffer* to the *Primer/Probe/Nucleotide Mix*
4. add 300  $\mu$ l of *PCR grade Water* to the *Internal Control DNA* and *Positive Control DNA*
3. incubate for 5 minutes at room temperature
4. vortex and centrifuge again

### 3.4 Experimental Protocols and Result Reading

#### 3.4.1 LightCycler® 1.2, 1.5 and 2.0 (with type 1 kits)

##### Program 1: Pre-incubation

Cycles 1  
Analysis Mode None

##### **Temperature Targets [°C] Segment 1**

Target Temperature [°C] 95  
Incubation time [min] 2:00  
Temperature Transition Rate [°C/s] 20.0  
Secondary Target Temperature [°C] 0  
Step Size [°C] 0.0  
Step Delay [Cycles] 0  
Acquisition Mode None



##### **LightCycler® 2.0:**

**Please check the correct settings for the „seek temperature“, this should be adjusted on at least 90 °C.**

##### Program 2: Amplification

Cycles 45  
Analysis Mode Quantification

##### **Temperature Targets [°C] Segment 1 Segment 2 Segment 3 Segment 4**

Target Temperature [°C]	95	55	60	72
Incubation time [s]	0	5	7	5
Temperature Transition Rate [°C/s]	20.0	20.0	20.0	20.0
Secondary Target Temperature [°C]	0	0	0	0
Step Size [°C]	0.0	0.0	0.0	0.0
Step Delay [Cycles]	0	0	0	0
Acquisition Mode	None	None	Single	None



**Segment 3 is essential for the performance of the kit. Do not skip or modify this step.**

##### Program 3: Cooling

Cycles 1  
Analysis Mode None

##### **Temperature Targets [°C] Segment 1**

Target Temperature [°C] 40  
Incubation time [s] 30  
Temperature Transition Rate [°C/s] 20.0  
Secondary Target Temperature [°C] 0  
Step Size [°C] 0.0  
Step Delay [Cycles] 0  
Acquisition Mode None

Result Reading:

- Select the fluorescence channels F1 and F2 or Channel 1 and Channel 3 at the LC 2.0
- Click on *Quantification* to generate the amplification plots and the specific ct-values
- The threshold will be generated automatically.
- Samples showing no significant increase in the amplification plot can be considered as negative.

target	<b>Ct-momp</b>	<b>Internal control</b>
channel for LC 1.2, 1.5	F1 (530)	F2 (640)
channel for LC 2.0	channel 1 (530)	channel 3 (610)

3.4.2 Rotorgene 6000 (5-plex) (with type 1 kits)

Program Step 1: Pre-incubation

Setting	Hold
Hold Temperature	95 °C
Hold Time	3 min 0 sec



**Please check the correct settings for the filter combination:**

**green filter (470-510): C. trachomatis (Ct-momp)**  
**filter orange (585-610): internal control**

Program Step 2: Amplification

Setting	Cycling
Cycles	45
Denaturation	95°C for 5 sec
Annealing	55°C for 10 sec —> <b>acquiring to Cycling A (green and orange)</b>
Elongation	72°C for 7 sec
Gain setting	automatic (auto Gain)
Slope Correct	activated
Ignore First	deactivated

Result Reading:

- Open the menu *Analysis*
- Select *Quantitation*
- Check the required filter set (green or orange) according to the following table and start data analysis by double click.
- The following windows will appear:
  - Quantitation Analysis - Cycling A* (green or orange)
  - Quant. Results - Cycling A* (green or orange)
  - Standard Curve - Cycling A* (green or orange)
- In window *Quantitation Analysis*, select first *inear scale* and than *slope correct*

Threshold setup (not applicable if a standard curve was carried with the samples and auto threshold was selected)

- In window *CT Calculation* set the threshold value to 0-1
- Pull the threshold line into the graph. Adapt the threshold line to the initial linear section of the positive control reaction.
- The ct-values can be taken from the window *Quant. Results*.
- Samples showing no ct-value can be considered as negative.

target	<b>Ct-momp</b>	<b>Internal control</b>
channel	green	orange

### 3.4.3 ABI 7500 (with type 2 kits)

#### Program Step 1: Pre-incubation

Setting Hold  
Temperature 95 °C  
Incubation time 3:00 min



**Please check the correct settings of the detectors!**

**target probe: FAM**

**internal control: VIC**

**quencher: none**

#### Program Step 2: Amplification

Cycles 45  
Setting Cycle  
Denaturing 95 °C für 30  
sek  
Annealing 55 °C für 30 sec  
Extension 60 °C für 45 sec

**The ROX reference needs to be disabled. Activate both detectors for each well. Measurement of fluorescence during extension.**

#### Result Reading:

- Enter the following basic setting at the right task bar:  
Data: Delta RN vs. Cycle  
Detector: FAM and VIC  
Line Color: Well Color
- Open a new window with for the *Graph settings* by clicking the right mouse button

target	<b>Ct-momp</b>	<b>Internal control</b>
channel	FAM	VIC

Select the following setting and confirm with *ok*:

Real Time Settings: Linear  
Y-Axis Post Run Settings: Linear and Auto Scale  
X-Axis Post Run Settings: Auto Scale  
Display Options: 2

- Initiate the calculation of the ct-values and the graph generation by clicking on *Analyze* within the report window.
- Pull the threshold line into the graph. Adapt the threshold line to the initial linear section of the positive control reaction.
- Samples showing no ct-value can be considered as negative.

### 3.5 PCR Master Mix Setup

Total volume per reaction is 25  $\mu\text{l}$ . When setting up reactions, calculations should also include positive (PC) and negative controls (NC). Pipette master mix on ice into a 1.5 ml reaction tube and mix gently.

#### Pipetting scheme:

	for 1 reaction	for 25 reactions*
<i>Primer/Probe/Nucleotide Mix</i>	14,0 $\mu\text{l}$	350,0 $\mu\text{l}$
<i>Internal Control DNA</i>	1,0 $\mu\text{l}$	25,0 $\mu\text{l}$
<i>MB DNA Polymerase</i>	1,0 $\mu\text{l}$	25,0 $\mu\text{l}$
total	16,0 $\mu\text{l}$	

\* the equivalent of the content of one red-capped vial



**The total duration from master mix preparation to PCR cycling must not exceed 45 minutes to avoid a decrease in the fluorescent signal.**

Aliquot 15  $\mu\text{l}$  of master mix into each PCR reaction tube. Discard the excess of master mix (1  $\mu\text{l}$ ).

Pipette 10  $\mu\text{l}$  of sample elution buffer or DNA-free water per tube as negative control. Seal the tubes. Add 10  $\mu\text{l}$  of sample per PCR reaction tube. Sealed these tubes as well before proceeding with the positive controls or standards. Add 10  $\mu\text{l}$  of the positive control to the remaining tubes as the last step in order to avoid cross contamination.

### 3.6 Result Interpretation

The presence of *C. trachomatis* in the sample is indicated by an increasing fluorescence signal in the *Ct-momp* channel during PCR. The concentration of the contaminant can be calculated by a software comparing the crossing cycle number of the sample with a standard curve created in the same run.

A successfully performed PCR without inhibition is indicated by an increasing fluorescence signal in the internal control channel, provided the Internal Control was added to the master mix. *C. trachomatis* DNA and Internal Control DNA are competitors in PCR. Because of the very low concentration of Internal Control in the PCR mix, the signal strength in this channel is reduced with increasing *C. trachomatis* DNA loads in the sample.

<b><i>Ct-momp</i> PCR</b>	<b>Internal Control</b>	<b>Interpretation</b>
positive	irrelevant	<i>C. trachomatis</i> positive
negative	negative	PCR inhibition
negative	positive	<i>C. trachomatis</i> negative

#### **4. Trouble shooting**

Before repeating a negative and a positive control run please check the cyclor protocol and pipetting scheme.

Insufficient (inhibition) or no amplification of the internal control may be due to the following reasons:

- programming mistake
- pipetting mistake
- sample elution buffer and sample used to complete the negative control are different

## 5. Performance Data

Performance Parameter	Performance Characteristics
Analytical sensitivity including purification	0.9 IFU/ $\mu$ l, corresponding to 2.4 GU/ $\mu$ l
Analytical sensitivity without purification	2.5 IFU/ $\mu$ l, corresponding to 8.1 GU/ $\mu$ l
Analytical specificity	100 % for serovars A - K and L1 - L3 no cross reactivity with relevant commensals
Diagnostic sensitivity urines: n = 61 ejaculates n = 21 swabs n = 61	urines: 93.6 % ejaculates: 100 % swabs: 100 %
Diagnostic specificity n = 143	100 %
Precision (intra assay)	4 % at 2000 GU/PCR
Precision (inter assay)	6 % at 2000 GU/PCR
Robustness	cross contamination rate: 0 % fatal error rate: 0 % matrix effects: 0 %
Additional Parameters	lot-to-lot variations: 0.9 % linearity: 200 to $2.0 \times 10^7$ GU/PCR pipetting time: < 60 minutes without negative effect inter laboratory comparison: Instand RV531 completed

## Related Products

### MB Taq DNA Polymerase

53-0050/-0100/-0200/-0250 MB Taq DNA Polymerase 50/100/200/250 units

### Clinical Diagnostic Kits for qPCR

20-2025/-2100/-2250	Venor <sup>®</sup> Mp-QP <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	25/100/250 tests
21-2025/-2100/-2250	Onar <sup>®</sup> Ls-QP <i>Legionella species</i>	25/100/250 tests
21-3025/-3100/-3250	Onar <sup>®</sup> Lp-QP <i>Legionella pneumophila</i>	25/100/250 tests
22-2025/-2100/-2250	Onar <sup>®</sup> MRSA Methicillin-resistant <i>S. aureus</i>	25/100/250 tests
23-2025/-2100	Onar <sup>®</sup> Tp <i>Treponema pallidum</i>	25/100 tests
24-2025/-2100/-2250	Onar <sup>®</sup> Ct <i>Chlamydia trachomatis</i>	25/100/250 tests
25-2025/-2100/-2250	Onar <sup>®</sup> Pertussis <i>Bordetella pertussis/parapertussis</i>	25/100/250 tests

### Quantification Standards, 100 µl each, 1x10<sup>6</sup> genomes/µl

52-0101	<i>Legionella pneumophila</i> DNA Standard
52-0119	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> DNA Standard

### Genomic DNA Extracts, 100 µl each, +/- 10 ng / 100 µl

51-0566	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , DSMZ 20566
51-5571	<i>Bordetella pertussis</i> , DSMZ 5571
51-3415	<i>Bordetella parapertussis</i> , DSMZ 13415
51-0177	<i>Ureaplasma urealyticum</i> , NC 10177
51-0111	<i>Mycoplasma hominis</i> , NC 010111
51-0112	<i>Mycoplasma orale</i> , NC 010112
51-0117	<i>Mycoplasma fermentans</i> PG19, NC 010117
51-0119	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , NC 010119
51-0129	<i>Mycoplasma arginini</i> , NC 010129
51-0162	<i>Mycoplasma arthritidis</i> , NC 010162
51-0195	<i>Mycoplasma genitalium</i> , NC 010195
51-1746	<i>Mycoplasma penetrans</i> , NC 11746

### DNA Remover™

15-2025	DNA Decontamination Reagent, spray bottle	250 ml
15-2200	DNA Decontamination Reagent, refill bottles	4 x 500 ml

### Extraktion Kit

56-1100	MB DNA Extraction Kit	100 extractions
---------	-----------------------	-----------------



