

23-2_112010 (de/en)

Art. Nr. / Ordering No. 23-2025/-2100

Onar[®] Syphilis

Treponema pallidum
Diagnostic Kit for qPCR

Gebrauchsinformation / Instructions for Use

Reagenzien für 25/100 Reaktionen
Reagents for 25/100 reactions

Hersteller / Manufacturer:

Minerva Biolabs GmbH, Koepenicker Strasse 325, 12555 Berlin, Germany

FOR PROFESSIONAL USE ONLY!
NUR FÜR ERFAHRENE ANWENDER!

ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK
FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE



Symbole



Zur in vitro Diagnostik / For in vitro diagnostic use



Ch.-Nr. / Lot no.



Art. Nr. / Order No.



Verfallsdatum / Expiry date



Lagerung bei / Store at



**Enthält Reagenzien für 25 oder 100 Bestimmungen
Contains reagents for 25 or 100 tests**



Hersteller / Manufacturer

ANWENDUNGSGEBIET

Dieses Kit dient der quantitativen Direktbestimmung von *Treponema pallidum* in Genitalabstrichen und Ejakulaten.

ERKLÄRUNG DES TESTS

Onar®*Syphilis* ist ein *in vitro* Testsystem zum quantitativen Nachweis von *Treponema pallidum* in klinischen Proben. Im Vergleich zu immunologischen Methoden, mit denen sich eine Syphiliserkrankung erst 2 bis 3 Wochen nach der Infektion nachweisen lässt, hat sich der PCR-basierte Erregernachweis insbesondere in der Frühdiagnostik bewährt. Gegenüber dem mikroskopischen Nachweis zeichnet sich die PCR durch eine höhere Präzision aus.

TESTPRINZIP

Der spezifische Erregernachweis erfolgt durch Amplifikation eines Fragmentes des für die Polymerase I kodierenden Gens (*poIA*). Dieser Genabschnitt kommt in allen *Treponema pallidum* Isolaten vor.

Zum Ausschluss falsch negativer Ergebnisse in Folge von PCR-Inhibitoren oder fehlgeschlagener DNA-Extraktion enthält der Onar®*Syphilis* eine interne Amplifikationskontrolle. Die Kontroll-DNA kann der Probe vor der DNA-Extraktion zugegeben und so zur Überprüfung des kompletten Analyseprozesses (DNA-Extraktion und PCR-Reaktion) verwendet werden. Zur ausschließlichen Überprüfung auf PCR-Inhibitoren wird die Kontroll-DNA dem PCR MasterMix zugegeben. Die Detektion der Kontrollreaktion erfolgt bei 610 nm (ROX-Kanal) und die Detektion der spezifischen Erregersequenz erfolgt bei 520 nm (FAM-Kanal).

Der *Primer/Probe/Nucleotide Mix* enthält dUTP statt dTTP, so dass die Option besteht verschleppte Amplifikate aus vorangegangenen Analysen durch Einsatz von Uracil-DNA Glycosylase (UNG) abzubauen und somit das Auftreten falsch positiver Ergebnis minimiert werden kann. UNG ist nicht Bestandteil von Onar®*Syphilis*.

ENTHALTENE REAGENZIEN

Jedes Kit enthält Reagenzien für 25 oder 100 Reaktionen. Das Verfallsdatum der ungeöffneten Packung ist auf dem Außenetikett vermerkt. Die Lagerung erfolgt bis zur Verwendung bei +2 bis +8 °C.

Das chargenspezifische Qualitätskontrollzertifikat (*Certificate of Analysis*) kann auf unserer Webseite heruntergeladen werden (www.minerva-biolabs.com).

Reagenz Bezeichnung	Anzahl		Deckelfarbe
	25 Reaktionen Art. Nr. 23-2025	100 Reaktionen Art. Nr. 23-2100	
Primer/Probe/Nucleotide Mix	1 x lyophilisiert	4 x lyophilisiert	rot
Rehydration Buffer	1 x 1,8 ml	2 x 1,8 ml	blau
Positive Control DNA	1 x lyophilisiert	1 x lyophilisiert	grün
Internal Control DNA	1 x lyophilisiert	1 x lyophilisiert	gelb
PCR grade Water	1 x 2,0 ml	1 x 2,0 ml	weiß

BENÖTIGTES, ABER NICHT IM KIT ENTHALTENES MATERIAL

Das Onar[®]*Syphilis* Kit enthält die Reagenzien für den spezifischen Nachweis von *Treponema pallidum*. Allgemein übliche Verbrauchsmaterialien und Reagenzien eines PCR Labors sind nicht enthalten. Dazu zählen:

- qPCR-Gerät mit Filtersets für die Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe FAM und ROX
- PCR-Reaktionsgefäße, passend für das qPCR-Gerät
- 1,5 ml Reaktionsgefäß, DNA- und RNA-frei
- Mikrozentrifuge für 1,5 ml und PCR-Reaktionsgefäße
- Pipette zum Ansetzen und Dispensieren des Reaktionsmixes mit Filterspitzen (10, 100 und 1000 µl)
- hot-start DNA-Polymerase (1 Unit/Test) mit einer Konzentration von 1 U/µl oder 5 U/µl

Dieser Kit erzielt exzellente Ergebnisse mit unserer MB *Taq* DNA-Polymerase (Cat # 53-0050/100/200/250). Die Polymerase ist nicht Bestandteil des Kits. Bei der Verwendung anderer Polymerasen kann keine umfassende Leistungsfähigkeit garantiert werden. Gerne senden wir Ihnen auf Anfrage ein kostenloses Testmuster der MB *Taq* (10 Units) zu.

PROBENMATERIAL

Zur Vermeidung einer Inhibition der PCR sollten die Proben in geeigneter Weise vorbereitet werden. Das Kit wurde mit den folgenden Extraktionsverfahren für Abstrichtupfer und Ejakulate validiert:

- Minerva Biolabs, MB DNA Extraction Kit (Art.Nr. 56-1100)
- Qiagen, QIAamp DNA Mini Kit (Art.Nr. 51 304), reguläres Protokoll für Abstrichproben bzw. spezielles Protokoll für Ejakulate: „Isolation of genomic DNA from sperm using the QIAamp[®] DNA Mini Kit; protocol 1“

Gute Erfahrungen wurden mit dem direkten Einsatz von ausgewaschenen Abstrichtupfern gemacht. Die Abstrichtupfer sollten nicht länger als 6 Stunden ungekühlt und nicht länger als 48 Stunden gekühlt transportiert worden sein. Besonders geeignet sind trockene Tupfer aus Dacron® oder Kunstfaser:

-
1. 200 µl Auswaschpuffer (10 mM Tris.HCl pH 8,5, 0,5 % Tween20) oder Swab Wash Buffer (Minerva Biolabs, Art. Nr. 57-1100) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (DNA-frei) vorlegen.

 2. Tupfer in den Auswaschpuffer stecken und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen

 3. Tupfer an der Seitenwand des Reaktionsgefäßes ausdrücken.

 4. Eluat direkt in den Test einsetzen
-

Die Qualität des Abstrichs durch den Einsender und die Art des verwendeten Abstrichtupfers beeinflusst unkontrollierbar die Menge enthaltener Begleitsubstanzen und damit direkt die Qualität des Probenmaterials. Die Methode kann daher nicht allgemeingültig validiert werden.

DNA-Extrakte und Abstricheluate lassen sich 6 Tage bei +2 bis +8 °C aufbewahren. Längere Lagerzeiten erfordern eine Temperatur von < -18 °C. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

VORSICHTSMAßNAHMEN

Zur in vitro Diagnostik.

Dieses Kit sollte nur von geschulten Personen verwendet werden.

Alle Patientenproben sollten als potentiell infektiös betrachtet und nach den lokalen oder nationalen Vorschriften behandelt werden.

Dieses Kit enthält keine Gefahrstoffe und kann gemäß den örtlichen Bestimmungen entsorgt werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Der Test sollte mit Negativ- und Positivkontrollen sowie den Patientenproben in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Zur Quantifizierung ist eine Verdünnungsreihe eines geeigneten Standards mitzuführen. Alle Reagenzien und Proben müssen vor dem Gebrauch auf +2 bis +8 °C gebracht werden.

1. Rehydratisierung der Reagenzien

Nach Rekonstitution können die Reagenzien bei $< -18\text{ °C}$ bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden und die rekonstituierten Reagenzien (Primer/Probe/Nucleotide Mix, Interne Amplifikationskontrolle und die Positivkontrolle) ggf. aliquotiert gelagert werden.

1.	Primer/Probe/Nucleotide Mix Internal Control	Deckel rot Deckel gelb	Alle Lyophilisate für 5 Sekunden bei max. Umdrehung der Tischzentrifuge zentrifugieren.
2.	Primer/Probe/Nucleotide Mix	Deckel rot	Zugabe von 365 μl Rehydratisierungspuffer (Deckel blau)
3.	Internal Control	Deckel gelb	Zugabe von 300 μl PCR grade Water (Deckel weiß)
4.	Positive Control	Deckel grün	Zugabe von 300 μl PCR grade Water (Deckel weiß)
5.	Primer/Probe/Nucleotide Mix Internal Control Positive Control	Deckel rot Deckel gelb Deckel grün	5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
6.	Primer/Probe/Nucleotide Mix Internal Control Positive Control	Deckel rot Deckel gelb Deckel grün	DNA kurz vortexen und für wenige Sekunden zentrifugieren

2. Herstellung des Reaktionsmixes

Der Reaktionsmix wird bei Raumtemperatur in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß für die benötigte Anzahl an Tests und Kontrollen angesetzt.

Pipettierschema bei Verwendung einer Polymerase mit einer Ausgangskonzentration von 5 U/ μl :

	für 1 Reaktion	für 25 Reaktionen
1.		
Primer/Probe/Nucleotide Mix	14,0 μl	350,0 μl
Internal Control DNA	1,0 μl	25,0 μl
Polymerase (5 U/ μl)	0,2 μl	5,0 μl

Pipettierschema bei Verwendung einer Polymerase mit einer Ausgangskonzentration von 1 U/ μl :

	für 1 Reaktion	für 25 Reaktionen
1.		
Primer/Probe/Nucleotide Mix	14,0 μl	350,0 μl
Internal Control DNA	1,0 μl	25,0 μl
Polymerase (1 U/ μl)	1,0 μl	25,0 μl

2. Reaktionsmix durch Schnippen des Gefäßes vorsichtig mischen.
3. In jedes PCR-Reaktionsgefäße 15 μl geben. Überschuss verwerfen

3. Beschickung der Testansätze

1. Negativkontrollen: Zugabe von wahlweise 10 µl Elutionspuffer der verwendeten DNA-Extraktion (vgl. Kapitel Probenmaterial) oder PCR Grade Water (Deckel weiß)
2. Proben: Zugabe von jeweils 10 µl Extrakt oder Eluat
3. Positivkontrollen: Zugabe von jeweils 10 µl Positive Control DNA (Deckel grün)
4. Alle Ansätze verschließen, kurz zentrifugieren, in den Thermocycler stellen und Thermocycler-Programm starten.

Zwischen der Herstellung des Mastermixes und dem Starten der PCR sollten nicht mehr als 45 Minuten vergehen, da es sonst zu einer Verringerung der Fluoreszenzausbeute kommen kann. Die Pipettierreihenfolge sollte eingehalten und die Reaktionsgefäße nach jedem Pipettieren sofort geschlossen werden.

4. Start der Reaktion

1. Beladung des Cyclers, dabei festen Sitz der PCR-Gefäße in den Gefäßaufnahmen des Gerätes und der Deckel auf den PCR-Gefäßen überprüfen.
2. Programmierung des PCR-Geräts oder Überprüfung gespeicherter Temperaturprofile. Im Anhang werden Temperaturprofile für marktgängige qPCR-Geräte aufgeführt. Protokolle für weitere qPCR-Geräte sind auf Anfrage verfügbar.
3. Start des PCR-Geräts und Aufzeichnung der Messdaten.

5. Darstellung der Testergebnisse

1. Speichern der Daten nach Beendigung des Programms
2. Auslesen der Kanäle für die Fluoreszenzfarbstoffe FAM und ROX
Darstellung der Daten als 2. Ableitung
3. Ermittlung der Ct-Werte für die Negativkontrollen, die Positivkontrollen und die Proben
4. Auswertung unter Beachtung der labor- und gerätespezifischen Referenzbereiche

Referenzbereiche für ausgewählte qPCR-Geräte:

qPCR-Gerät	Hersteller	Bewertung des <i>threshold cycle</i>		
		positiv	grenzwertig	negativ
LightCycler 1.2	Roche	< 40	≥ 40	kein Ct
ABI 7500	Applied Biosystems	< 40	≥ 40	kein Ct
Rotorgene 6000	Corbett	< 40	≥ 40	kein Ct
Mx3005P	Agilent	< 40	≥ 40	kein Ct

ANMERKUNGEN ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

1. Diese Gebrauchsinformation muss für eine erfolgreiche Benutzung des Onar[®]Syphilis weitgehend verstanden worden sein. Die gelieferten Reagenzien einer Charge sind als integrale Einheit zu verstehen. Reagenzien verschiedener Chargen dürfen nicht vermischt werden. Die Reagenzien des Kits dürfen nach Ablauf der Haltbarkeit nicht mehr verwendet werden.
2. Jegliche Abweichung vom Testverfahren kann die Resultate beeinträchtigen.
3. Bei Verwendung anderer als der validierten MB Taq DNA Polymerase sind die unter „Benötigtes, aber nicht im Kit enthaltene Material“ aufgeführten Hinweise zu beachten. Die Menge an Polymerase kann bis 2,5 U/Reaktion erhöht werden. Bitte beachten Sie, dass sich dann das Pipettierschema für den Reaktionsmix verändert.
4. Inhibitionen können durch die Probenmatrix direkt aber auch durch den Probenelutionspuffer anderer DNA-Extraktionskits als der Empfohlenen verursacht werden. Die Negativkontrollen sollten daher immer mit dem verwendeten Probenelutionspuffer komplettiert werden.
5. Je Ansatz sollte mindestens eine Negativkontrolle mitgeführt werden, die auch die Probenaufbereitung berücksichtigt. Die Mitführung einer Positivkontrolle erleichtert die Auswertung. Typische Ct-Werte für die Interne Kontrolle und die Positivkontrolle werden auf dem *Certificate of Analysis* ausgewiesen und können zur orientierenden Qualitätskontrolle dienen.
6. Die Verwendung von Kontrollproben ist ratsam, um die Von-Tag-zu-Tag-Gültigkeit der Resultate zu sichern. Die Kontrollen sollten in gleicher Weise wie die Proben durchgeführt werden. Es wird dem Labor empfohlen eigene Kontrollproben mit einem hohen, medialen und niedrigen (z.B. 3x LOD₉₅) Niveau herzustellen. Eine Teilnahme an externen Qualitätskontrollprogrammen, wie z.B. von der INSTAND e. V. Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien e. V. angeboten, wird empfohlen.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Wie bei allen diagnostischen Tests darf die endgültige klinische Beurteilung nicht auf den Resultaten eines einzelnen Tests beruhen, sondern sollte vom Arzt erst nach der Evaluation aller klinischen Daten und Laborbefunde erfolgen.

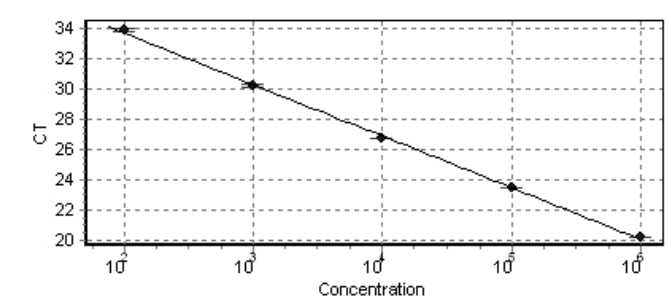
Die hier angegebenen Werte dienen nur als Richtlinie. Jedes Labor sollte seinen eigenen Referenzbereich für die Ct-Werte der Kontrollen und den Nachweisbereich erstellen.

Nachweis von <i>Treponema pallidum</i> FAM-Kanal	Interne Kontrolle ROX-Kanal	Interpretation
positiv	irrelevant	<i>Treponema pallidum</i> positiv
negativ	negativ	Inhibition der PCR
negative	positiv	<i>Treponema pallidum</i> negativ

Die Präsenz von *Treponema pallidum* in der Probe wird durch einen Anstieg des Fluoreszenzsignals im Target-Kanal 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 hohen Konzentrationen an Target-DNA nicht mehr amplifiziert wird. Eine erfolgreiche PCR ist dann durch das Signal im Target-Kanal erkennbar.

ANALYTISCHE CHARAKTERISTIKA DES TESTS

Eine typische Standardkurve für Onar®*Syphilis* ist unten dargestellt. Die Linearregression wurde aus 4 Replikaten je Verdünnungsstufe mit dem RotorGene 6000 ermittelt.



Präzision

Die Präzision des Onar®*Syphilis* wurde unter Verwendung eines klonierten Fragments des Zielgens (Plasmid-DNA) bei drei verschiedenen Konzentrationen auf einem RotorGene 6000 Instrument ermittelt.

Die dargestellte Intraassay Variation basiert auf der Streuung der Ct-Werte von Proben gleicher Konzentration.

Konzentrations-niveau	Genomeinheiten (GE) pro Test	Intraassay Variation [% VK]	Interassay Variation [% VK]
Niedrig	100	1,18	1,82
Mittel	1.000	0,70	1,94
Hoch	10.000	0,25	1,49

nen (100 GE/PCR, 1000 GE/PCR, 10000 GE/PCR) innerhalb eines Testansatzes mit je 4 Replikaten pro Konzentration. Angegeben ist der Mittelwert des Variationskoeffizienten (VK) aus 6 Wiederholungen. Die dargestellte Interassay Variation basiert auf der Streuung der Ct-Werte von Proben gleicher Konzentrationen (100 GE/PCR, 1000 GE/PCR, 100000 GE/PCR) aus 6 unabhängigen Testansätzen mit je 4 Replikaten pro Konzentration.

Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität ist normalerweise besser als 20 GE/Test (n=24).

Kreuzreaktivität

Eine Kreuzreaktivität mit Mikroorganismen der Genitalflora (*Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Candida albicans*) oder DNA humanem Ursprungs konnte nicht gefunden werden.

Anhang: Programmierung und Datenerfassung verschiedener qPCR-Geräte

1. LightCycler® 1.2, 1.5 und 2.0

Programmschritt 1: Vorinkubation

Zyklen	1
Analysemodus	None
Temperaturprofil [°C]	Segment 1
Zieltemperatur [°C]	95
Inkubationszeit [min]	2:00
Temperaturanstiegsrate [°C/s]	20.0
zweite Zieltemperatur [°C]	0
Temperaturschritte [°C]	0.0
Verzögerung [Zyklen]	0
Fluoreszenzmessung	None

Die Dauer der Vorinkubation bei 95 °C ist von der verwendeten Polymerase abhängig. Bei anderen Hot-Start-Enzymen muss die Vorinkubation zur Aktivierung entsprechend verlängert werden. Bitte entnehmen Sie die Dauer dem Beipackzettel Ihrer Polymerase.

LightCycler® 2.0:

Bitte stellen Sie die „Seek Temperature“ auf mindestens 90 °C ein.

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

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.

	<i>Treponema</i>	Interne Kontrolle
Kanäle beim LC 1.2, 1.5	F1	F2
Kanäle bei LC 2.0	Channel 1	Channel 3

2. Rotorgene 6000 (5-plex)

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: 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 → Datenerfassung (Filter Green und Orange)
Extension	60 °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 plazieren. 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.

	<i>Treponema</i>	Interne Kontrolle
Kanal	Green	Orange

3. ABI 7500

Detektoreinstellungen:

für die Target-DNA Sonde: Reporter - FAM Quencher - none
für die Interne Kontroll-Sonde: Reporter - ROX Quencher - none

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

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

Auswertung der Rohdaten:

- Die Grundeinstellungen erfolgen in der rechten Funktionsleiste:

Data: Delta RN vs. Cycle
Detector: FAM und ROX
Line Color: Well Color

	Treponema	Interne Kontrolle
Kanal	FAM	ROX

- 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 gelegt werden.
- Proben ohne ausgewiesenen ct-Wert sind als negativ zu werten.

4. Mx3005P

- im Setupmenü, Reiter Plate Setup“ die belegten Wells markieren
- unter Collect Fluorescence Data FAM und ROX auswählen
- Reference Dye of „none“ setzen entsprechend Grundeinstellung
- unter „well type“ können die Art der Probe (Negativ- oder Positivkontrolle, Probe, Standard) spezifiziert werden
- Eingabe des Temperaturprofils unter Reiter „Thermal Profile Design“:
 - Segment 1 (Pre-Melt): 3 min, 95 °C
 - Segment 2: 15 sec, 95 °C
 - 15 sec, 55 °C
 - 1 min, 60 °C
 - data collection end, 45 Zyklen
- Unter Menü „Run“ im Fenster „Run Status“ auf „Start“ klicken

Auswertung der Rohdaten:

- im Menü „Analysis“ auf Reiter „Analysis Selecection/Setup“ zu analysierende Positionen markieren
- im Fenster „algorithm enhancement“ müssen die Optionen:
 - Amplification-based threshold
 - Adaptive baseline
 - Moving avergaeaktiviert sein
- auf Reiter „Results“ und „Amplification Plots“ den Threshold automatisch setzen und die Ct-Werte unter „Text Report“ ablesen

Leerseite
Blank page

Leerseite
Blank page

INDICATION

This kit is used for simultaneous and quantitative direct determination of *Treponema pallidum* in genital swabs and ejaculates.

EXPLANATION OF THE TEST

Onar®*Syphilis* is a clinical in vitro test system for quantitative detection of *Treponema pallidum* in patient samples. Compared to immunological methods that can detect syphilis disease first after 2 to 3 weeks of infection, the PCR-based detection of pathogens has proven qualities especially in the early diagnosis. Compared with the detection by microscopy, PCR is characterized by a higher sensitivity and precision.

TEST PRINCIPLE

The pathogen is specifically detected by amplifying a fragment of the polymerase I encoding gene *poI*A. This gene segment was found in all *Treponema* isolates.

False negative results due to PCR inhibitors or improper DNA extraction are detected by the internal amplification control. The Internal Control DNA can be added to the sample prior to DNA extraction and analysis for verification of the complete process (DNA extraction and PCR reaction). The Internal Control DNA can also be added directly to the PCR master mix to act as a PCR control only. The amplification of the control reaction is detected at 610 nm (ROX channel) and the pathogen-specific sequence at 520 nm (FAM channel).

The Primer / Probe / Nucleotide Mix contains dUTP instead of dTTP, so the option is available to degrade amplicons from previous analysis by use of uracil-DNA glycosylase (UNG). Thus the occurrence of false-positive result can be minimized. UNG is not part of Onar®*Syphilis*.

REAGENTS

Each kit contains reagents for 25 or 100 reactions. The expiry date of the unopened package is marked on the package label. The kit components are stored until use at +2 to +8 °C. The lot specific quality control certificate (*Certificate of Analysis*) can be downloaded from our website (www.minerva-biolabs.com).

Kit Component Label Information	Quantity		Cap Color
	25 reactions Order No. 23-2025	100 reactions Order No. 23-2100	
Primer/Probe/Nucleotide Mix	1 x lyophilized	4 x lyophilized	red
Rehydration Buffer	1 x 1.8 ml	2 x 1.8 ml	blue
Positive Control DNA	1 x lyophilized	1 x lyophilized	green
Internal Control DNA	1 x lyophilized	1 x lyophilized	yellow
PCR grade Water	1 x 2.0 ml	1 x 2.0 ml	white

NEEDED, BUT NOT INCLUDED IN THE KIT

The Onar®*Syphilis* kit contains the reagents for the specific detection of *Treponema pallidum*. General industrial supplies and reagents, usually available PCR laboratories are not included:

- qPCR device with filter sets for the detection of the fluorescence dyes FAM and ROX
- PCR reaction tubes for the specific qPCR device
- 1,5 ml reaction tubes, DNA- and RNA-free
- Micro centrifuge for 1.5 ml PCR reaction tubes
- Pipettes with corresponding filter tips to prepare and dispense the reaction mix (10, 100 und 1000 µl)
- hot-start DNA polymerase (1 unit/reaction) with a concentration of 1 U/µl or 5 U/µl

This test provides excellent results with MB *Taq* DNA polymerase (Cat # 53-0050/100/200/250). The polymerase is not part of the kit. A suitable performance of other polymerases can not be guaranteed. Please request your free samples of MB *Taq* polymerase (10 units).

SPECIMEN

To avoid inhibition of PCR, samples should be appropriately prepared. The assay was validated using the following extraction procedures for swab and sputum:

- Minerva Biolabs, MB DNA Extraction Kit (No. 56-1100)
- Qiagen, QIAamp DNA Mini Kit (No. 51 304), regular protocol for swab samples or special protocol for ejaculates: „Isolation of genomic DNA from sperm using the QIAamp® DNA Mini Kit; protocol 1“

Good experiences were made with the direct use of swabs squeezed in an appropriate buffer solution. The swab should not be stored for longer than 6 hours without and not longer than 48 hours with refrigeration. Particularly suitable are dry swab from Dacron® or synthetic fibers

-
1. Pipette 200 µl wash buffer (10 mM Tris.HCl pH 8.5, 0.5 % Tween20) or Swab Wash Buffer (Minerva Biolabs, Order No. 57-1100) into a 1.5 ml reaction tube

 2. Stick the swab into the buffer, incubate for 5 min at room temperature

 3. Squeeze out the buffer by pressing the swab against the inner wall of the reaction tube

 4. Use the eluate directly for PCR

The quality of the smear taken by the sender and the type of swab used may have uncontrollable influences on the amount of accompanied substances and thus on the quality of the sample material. It is not possible to validate this practicable method universally and in appropriate detail. DNA extracts and eluates can be kept for 6 days at +2 to +8 °C. Longer storage times require a temperature of -18 °C. Repeated freezing and thawing should be avoided.

PRECAUTIONS

For in vitro diagnostic use. This kit should be used only by trained persons. All samples should be considered potentially infectious and handled at the local or national regulations. This kit does not contain hazardous substances and may be disposed of according to local regulations.

TEST PROCEDURE

The test should be carried out with negative and positive controls and patient samples in duplicate. For quantification, a dilution series of an appropriate standard is kept. All reagents and samples must be equilibrated to +2 to +8 °C prior use.

1. Rehydration of the Reagents

After reconstitution, the reagents should be stored at below -18 °C. Repeated freezing and thawing should be avoided and reconstituted controls (internal amplification control and the positive control) stored in aliquots.

1.	Primer/Probe/Nucleotide Mix Internal Control	red cap yellow cap	Spin all lyophilized components for 5 sec at maximum speed of the mini centrifuge
2.	Primer/Probe/Nucleotide Mix	red cap	Add 365 µl rehydration buffer (blue cap)
3.	Internal Control	yellow cap	Add 300 µl PCR grade Water (white cap)
4.	Positive Control	green cap	Add 300 µl PCR grade Water (white cap)
5.	Primer/Probe/Nucleotide Mix Internal Control Positive Control	red cap yellow cap green cap	Incubate 5 min at room temperature
6.	Primer/Probe/Nucleotide Mix Internal Control Positive Control	red cap Deckel gelb Deckel grün	Vortex DNA briefly and spin for 5 sec

2. Preparation of the Reaction Mix

Prepare the required amount of master mix at room temperature in a 1.5 ml reaction tube for all control and test reactions.

Pipetting schema using a polymerase with a concentration of 5 U/µl:

	for 1 reaktion	for 25 reactions
1.		
Primer/Probe/Nucleotide Mix	14,0 µl	350,0 µl
Internal Control DNA	1,0 µl	25,0 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	5,0 µl

Pipetting schema using a polymerase with a concentration of 1 U/µl:

	for 1 reaktion	for 25 reactions
2.		
Primer/Probe/Nucleotide Mix	14,0 µl	350,0 µl
Internal Control DNA	1,0 µl	25,0 µl
Polymerase (1 U/µl)	1,0 µl	25,0 µl

2. Homogenize the reaction mix by carefully snapping the tube

3. Add 15 µl to each PCR tube, discard remaining material.

3. Loading the test tubes

1. Negative Controls: add 10 μ l elution buffer from DNA extraction (ref. chapter Sample Material) or PCR Grade Water (white cap)
2. Sample: add 10 μ l of eluate or extract
3. Positive Control: add 10 μ l Positive Control DNA (green cap)
4. Close and spin all PCR tubes briefly, load the qPCR cyclers and start the program

Preparation of the master mix and sample loading should not take more than 45 minutes to avoid a reduction in the fluorescent signal. The pipetting sequence should be respected and the tubes closed after each sample load.

4. Starting the reaction

1. Load the cycler, check each PCR tube and the cycler lid for tight fit
2. Program the qPCR cycler or check stored temperature profiles.
See Appendix for temperature profiles of selected qPCR cyclers. Programs for additional cyclers might be available on request.
3. Start the program and data reading.

5. Result reading

1. Save the data at the end of the run.
2. Read the channels for the fluorescence dyes FAM and ROX and show the 2nd deviation of the data.
3. Read the calculation of the Ct values for the negative controls, the positive controls and the samples
4. Evaluate in accordance with the laboratory and instrument-specific reference ranges

Reference range for selected qPCR devices:

qPCR device	Manufacturer	Evaluating the threshold cycle		
		positive	borderline	negative
LightCycler 1.2	Roche	< 40	\geq 40	no Ct
ABI 7500	Applied Biosystems	< 40	\geq 40	no Ct
Rotorgene 6000	Corbett	< 40	\geq 40	no Ct
Mx3005P	Agilent	< 40	\geq 40	no Ct

NOTES ON THE TEST PROCEDURE

1. This leaflet must be widely understood for a successful use of Onar®*Syphilis*. The reagents supplied should not be mixed with reagents from different lots and used as an integral unit. The reagents of the kit should not be used beyond its shelf life.
2. Any deviation from the test method can affect the results.
3. When using other than the validated MB Taq DNA polymerase please note the instructions outlined in the section "Required but not provided material". The amount of polymerase can be increased to 2.5 U/reaction. Please note that the pipetting scheme of the reaction mix needs to be recalculated.
4. Inhibition may be caused by the sample matrix, but also by sample elution buffer of DNA extraction kits not recommended or validated. Negative controls should always be completed with the use sample elution buffer.
5. For each test setup, at least one negative control may be included also including sample preparation. Positive controls facilitate the evaluation of the test. Typical Ct values for the internal control and positive control are shown on the *Certificate of Analysis* and can be used for orienting quality control.
6. The use of control samples is advised to secure the day-to-day validity of results. The controls should be carried out in the same manner as the samples. It is recommended to run laboratory specific control samples with a high, medial and low (e.g. 3x LOD₉₅) level. Participation in external quality control programs, such as offered by the INSTAND e.V., the Society for the promotion of quality assurance in medical laboratories, is recommended.

INTERPRETATION OF RESULTS

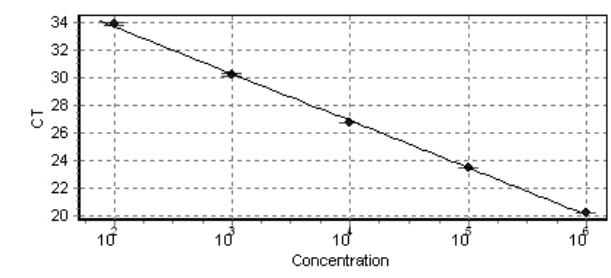
As with all diagnostic tests the final clinical assessment should not be based on the results of a single test, but should be done by doctors only after the evaluation of all clinical and laboratory findings. The values given here are only a guide. Each laboratory should establish its own reference range for the Ct values of controls and samples.

Detection of <i>Treponema pallidum</i> FAM channel	Internal control ROX channel	Interpretation
positive	irrelevant	<i>Treponema pallidum</i> positive
negative	negative	PCR inhibition
negative	positive	<i>Treponema pallidum</i> negative

The presence of *Treponema pallidum* in the sample is indicated by an increasing fluorescence signal in the target channel. When using the internal control, an error-free PCR is indicated by an increasing fluorescence signal in the channel for internal control. The Internal control is present at a very low concentration that it is no longer amplified at high concentrations of target DNA. A successful PCR is then detected by the signal in the target channel.

ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF THE TEST

A typical standard curve for Onar[®]Syphilis is shown below. The linear regression was determined from 4 replicates of each dilution step with a RotorGene 6000.



Precision

The precision of the Onar[®]Syphilis was determined using a cloned fragment of the target gene (plasmid DNA) at three different concentrations at a Rotorgene 6000 instrument.

Target level	Genome Units/reaction	Intra-assay variation [% CV]	Inter-assay variation [% CV]
low	100	1.18	1.82
middle	1,000	0.70	1.94
high	10,000	0.25	1.49

The intra-assay variation shown is based on the variability in the Ct values of samples with the same concentrations (100 GU/PCR, 1000 GU/PCR, 10000 GU/PCR) in a test batch with 6 replicates per concentration. Reported is the mean coefficient of variation (CV) from 4 replicates. The inter-assay variation shown is based on the variability in the Ct values of samples with the same concentrations (100 GU/PCR, 1000 GU/PCR, 100000 GU/PCR) from 6 independent assays, each with 4 replicates per concentration.

Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity is typically better than 20 GU/test (n = 24).

Cross-reactivity

A cross-reactivity with microorganisms of the genital tract flora (*Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Candida albicans*) or human DNA origin could not be found.

Appendix: Programming and data recording devices of different qPCR

1. LightCycler® 1.2, 1.5 and 2.0

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“ of at least 90 °C.

The pre-incubation time depends on the polymerase used. Hot start enzymes need to be activated at 95°C. Please see polymerase data sheet for duration

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

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 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.

	<i>Treponema</i>	Internal Control
channel for LC 1.2, 1.5	F1 (520)	F2 (610)
channel for LC 2.0	channel 1 (520)	channel 3 (610)

2. Rotorgene 6000 (5-plex)

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): Treponema
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 —> acquiring to Cycling A (green and orange)
Elongation	72 °C for 7 sec
Gain setting	automatic (auto Gain)
Slope Correct	activated
Ignore First	deactivated

The pre-incubation time depends on the polymerase used. Hot start enzymes need to be activated at 95 °C. Please see polymerase data sheet for duration.

Result Reading:

- Open the menu *Analysis*
- Select *Quantitation*
- Check the required filter set (green and 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 *linear scale* and then *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.

	<i>Treponema</i>	Internal Control
channel	green	orange

3. ABI 7500

Detector Settings:

Treponema Target Probe: Reporter - FAM Quencher - none
Internal Control Probe: Reporter - ROX Quencher - none

The ROX Reference needs to be disabled. Activate both detectors for each well.

Measurement of fluorescence during extension.

Program Step 1: Pre-incubation

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

The pre-incubation time depends on the polymerase used. Hot start enzymes need to be activated at 95 °C. Please see polymerase data sheet for duration.

Program Step 2: Amplification

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

Result Reading:

- Enter the following basic setting at the right task bar:

Data: Delta RN vs. Cycle
Detector: FAM and ROX
Line Color: Well Color

	<i>Treponema</i>	Internal Control
channel	FAM	ROX

- Open a new window with for the *Graph settings* by clicking the right mouse button
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.

4. Mx3005P

- Go to the setup menu, click on „Plate Setup“, check all positions which apply
- Click on „Collect Fluorescence Data“ and check FAM and ROX
- Corresponding to the basic settings the „Reference Dye“ function should be deactivated
- Specify the type of sample (negative or positive control, sample, standard) at „well type“
- Edit the temperature profile at „Thermal Profile Design“:
 - Segment 1 (Pre-Melt): 3 min, 95 °C
 - Segment 2: 10 sec, 95 °C
 - 20 sec, 55 °C
 - 20 sec, 72 °C
 - data collection end, 45 cycles
- at menu „Run Status“ select „Run“ and start the cycler by pushing „Start“

Analysis of raw data:

- In the window "Analysis" tab on "Analysis Selection / Setup" to analyze the marked positions
- Ensure that in window „algorithm enhancement“ all options are activated:
 - Amplification-based threshold
 - Adaptive baseline
 - Moving average
- Click on „Results“ and „Amplification Plots“ for an automatic threshold
- Read the Ct values at „Text Report“

APPENDIX

Limited Product Warranty

This warranty limits our liability for replacement of this product. No warranties of any kind, express or implied, including, without limitation, implied warranties of merchantability or fitness for a particular purpose, are provided. Minerva Biolabs shall have no liability for any direct, indirect, consequential, or incidental damages arising out of the use, the results of use, or the inability to use this product.

Limited License

The use of this product for clinical diagnostics of pathogens is covered by a Scorpions license from DxS Ltd. Further information on Scorpions licenses can be obtained from DxS Ltd, 48 Grafton St, Manchester, UK M13 9XX.

Trademarks

LightCycler is a registered trademark of a member of the Roche Group. ABI Prism is a registered trademark of Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries in the US and certain other countries. FAM™ and ROX™ are trademarks of Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries in the US and certain other countries. Mx3005P is a trademark of Agilent Technologies. Dacron® is a registered trademark of DuPont. Onar is registered trademarks of Minerva Biolabs GmbH.

Letzte fachliche Überarbeitung: November 2010

Last technical revision: november 2010

Related Products

MB Taq DNA Polymerase

53-0050/-0100/-0200/-0250	MB Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	50/100/200/250 units
53-1050/-1100/-1200/-1250	MB Taq DNA Polymerase (1 U/μl)	50/100/200/250 units

Clinical Diagnostic Kits for qPCR

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

Quantification Standards, 100 μl each, 1x10⁶ 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
---------	-----------------------	-----------------