

GenoType[®] MTBDRsl

VER 1.0

CE

Deutsch: S. 2-7

English: p. 8-14

GenoType® MTBDRsI

Molekulargenetisches Testsystem zur Identifizierung von Fluorchinolon-, Aminoglycosid/zyklischen Peptid- und Ethambutol-Resistenzen des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes

Methodik

Der GenoType® MTBDRsI-Test beruht auf der DNA-STRIP®-Technologie und erlaubt die molekulargenetische Identifizierung des *M. tuberculosis*-Komplexes und dessen Resistenz gegen Fluorchinolone (z.B. Ofloxacin und Moxifloxacin) und/oder Aminoglycoside/zyklische Peptide (injizierbare Antibiotika wie z.B. Capreomycin, Viomycin/Kanamycin, Amikacin) und/oder Ethambutol aus Kulturproben oder pulmonalem mikroskopisch-positivem Direktmaterial. Der Nachweis einer Fluorchinolon-Resistenz wird durch den Nachweis der wichtigsten Mutationen des *gyrA*-Gens (kodiert für die DNA-Gyrase) geführt. Zur Identifizierung von Aminoglycosid/zyklischen Peptid-Resistenzen wird das 16S rRNA-Gen (*rrs*) und zur Identifizierung von Ethambutol-Resistenzen das *embB*-Gen (kodiert zusammen mit *embA* und *embC* für die Arabinosyltransferase) untersucht.

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

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

Lagerung und Vorsichtsmaßnahmen

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

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

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

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

Das **Denaturierungsreagenz** (DEN) enthält <2% (w/w) NaOH und wirkt reizend. Es gelten R 36/38 sowie S 26-37/39-45.

Das **Substrat-Konzentrat** (SUB-C) enthält Dimethylsulfoxid und wirkt reizend. Es gelten R 36/37/38 und S 23-26-36.

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

Qualitätssicherung

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

- eine Konjugatkontrollzone, die eine erfolgreiche Konjugatbindung und Substratreaktion anzeigt
- eine Amplifikationskontrollzone, die eine erfolgreiche Amplifikationsreaktion anzeigt
- drei Locuskontrollzonen (*gyrA*, *rrs* und *embB*), die die optimale Sensitivität der Reaktion für jeden getesteten Gen-Locus kontrollieren

DNA-Isolierung

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

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

- 1a. Bei Verwendung von Koloniematerial mit einer Impfpöse Bakterien abnehmen und in ca. 300 µl Wasser (*molecular biology grade*) suspendieren.
- 1b. Bei Verwendung von Flüssigkulturen 1 ml Bakterienkultur, bei Verwendung von Direktmaterial 500 µl einer dekontaminierten* Probe durch fünfzehnminütige Zentrifugation bei ca. 10000 x g in einer Standard-Tischzentrifuge mit Aerosolschutzrotor in einer Sicherheitswerkbank der Klasse II pelletieren. Überstand verwerfen und Bakterien unter Vortexen in 100-300 µl Wasser (Kulturproben) bzw. 100 µl Wasser (Direktproben) resuspendieren.
2. Bakteriensuspension aus 1a oder 1b 20 min bei 95°C im Wasserbad inkubieren.
3. Probe 15 min in einem Ultraschallbad beschallen (optional bei Kulturproben).
4. Probe 5 min bei höchster Drehzahl abzentrifugieren und 5 µl des Überstandes zur PCR einsetzen. Soll die DNA-Lösung über einen längeren Zeitraum gelagert werden, den Überstand in ein neues Gefäß überführen.

* Die Proben sind unter Anwendung der NALC-NaOH-Methode gemäß den Empfehlungen der CDC-Veröffentlichung „Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory“ aufzubereiten.

Detaillierte DNA-Isolierungsprotokolle können unter www.hain-lifescience.de angefragt werden.

Amplifikation

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

Pro Ansatz werden benötigt:

- 35 µl PNM – im Kit enthalten
- 5 µl 10-fach Polymerase-Puffer – nicht im Kit enthalten
- x µl MgCl₂-Lösung¹¹ – nicht im Kit enthalten
- 1-2 Unit(s) thermostabile DNA-Polymerase (Angaben des Herstellers beachten) – nicht im Kit enthalten
- y µl Wasser zum Auffüllen auf 45 µl (ohne Berücksichtigung des Enzymvolumens) – nicht im Kit enthalten
- 5 µl DNA-Lösung zugeben. Dies ergibt ein Endvolumen von 50 µl (ohne Berücksichtigung des Enzymvolumens).

¹¹ Je nach eingesetztem Enzym/Puffersystem liegt die optimale MgCl₂-Endkonzentration zwischen 1,5 und 2,5 mM. Beachten Sie, dass manche 10-fach Polymerase-Puffer bereits MgCl₂ enthalten.

Die Leistungsbewertungsprüfung des **GenoType® MTBDRsl**-Assays erfolgte mit der HotStarTaq DNA-Polymerase der Fa. Qiagen. Bei Verwendung dieses Enzyms werden pro Probe benötigt:

- 35 µl PNM – im Kit enthalten
- 5 µl 10x PCR Buffer für HotStarTaq (enthält 15 mM MgCl₂) – nicht im Kit enthalten
- 2 µl 25 mM MgCl₂-Lösung – nicht im Kit enthalten
- 0,2 µl (1 U) HotStarTaq – nicht im Kit enthalten
- 3 µl Wasser (*molecular biology grade*) – nicht im Kit enthalten
- 5 µl DNA-Lösung (in getrenntem Bereich zugeben)

Die Endkonzentration an MgCl₂ in diesem Amplifikationsansatz beträgt 2,5 mM.

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

Programmierungsprotokoll für Thermocycler²¹:

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

²¹ Gilt für die bei der Validierung verwendete Taq-Polymerase. Bei anderen „Hot Start“ DNA-Polymerasen muss der erste Schritt eventuell verkürzt werden (Herstellerangaben beachten).

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

Zur Überprüfung der Amplifikationsreaktion können 5 µl des betreffenden Amplifikates direkt ohne Zugabe von Ladepuffer auf ein zweiprozentiges Agarosegel aufgetragen werden. Die Amplifikationsprodukte haben eine Länge von ca. 63 bp (Amplifikationskontrolle), 115 bp (*M. tuberculosis*-Komplex), 123 bp (*gyrA*), 263 bp (*rrs*) bzw. 138 bp (*embB*).

Hybridisierung

Vorbereitung

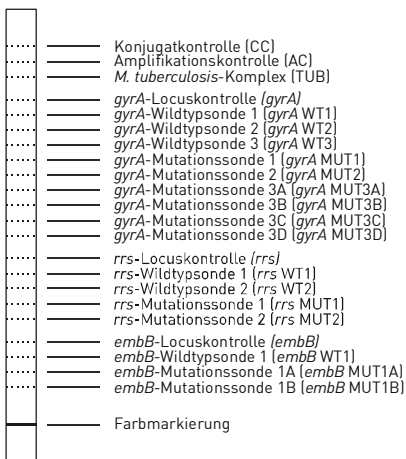
Schüttelwasserbad/TwinCubator® auf 45°C vorwärmen; die maximal zulässige Abweichung von der Solltemperatur beträgt +/-1°C. Lösungen HYB und STR vor Gebrauch auf 37-45°C erwärmen. Auf Präzipitatzfreiheit achten und gegebenenfalls vorsichtig schütteln. Alle anderen Reagenzien (außer CON-C und SUB-C) auf Raumtemperatur temperieren. Lösung CON-D weist eine leichte Trübung auf. Konjugat-Konzentrat (CON-C, orange) und Substrat-Konzentrat (SUB-C, gelb) werden in geeigneten Gefäßen in der benötigten Menge im Verhältnis 1:100 mit dem zugehörigen Puffer verdünnt (**CON-C mit CON-D, SUB-C mit SUB-D**), gut gemischt und auf Raumtemperatur temperiert. Pro Membranstreifen werden je 10 µl Konzentrat mit je 1 ml des entsprechenden Puffers verdünnt. CON-C stets vor Gebrauch frisch verdünnen. Verdünntes SUB-C ist lichtgeschützt und bei Raumtemperatur mindestens 4 Wochen stabil.

1. **Für jede zu untersuchende Probe in die untere Ecke einer Wannenkavität 20 µl Denaturierungsreagenz (DEN, blau) pipettieren.**
2. **Je 20 µl Amplifikat zugeben, durch Auf- und Abpipettieren gut mischen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.**
Währenddessen Membranstreifen (STRIPS) mit einer Pinzette aus dem Röhrchen nehmen und mit einem Bleistift unter der Farbmarkierung beschriften. Membranstreifen nur mit Handschuhen berühren.
3. **Jeweils 1 ml vorgewärmten und gemischten Hybridisierungspuffer (HYB, grün) zugeben. Die Wanne auf einer Unterlage so lange vorsichtig schwenken, bis die Lösung eine homogene Färbung aufweist.**
Darauf achten, dass keine Lösung in benachbarte Kavitäten gelangt.
4. **In jede benutzte Kavität einen Membranstreifen legen.**
Die Membranstreifen müssen dabei vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sein und die beschichtete Seite (kenntlich durch die Farbmarkierung) muss nach oben weisen. Membranstreifen, die sich wenden, mit einer Pinzette zurückdrehen. Zur Vermeidung von Kontaminationen die Pinzette nach jeder Benutzung reinigen. Dies gilt auch für alle nachfolgenden Inkubations- und Waschschrte.
5. **Wanne für 30 Minuten bei 45°C im Schüttelwasserbad/TwinCubator® inkubieren.**
Schüttelfrequenz des Wasserbads so wählen, dass eine stetige Durchmischung der Flüssigkeit erreicht wird, aber eine Kontamination benachbarter Kavitäten durch Spritzen vermieden wird. Um eine gute Wärmeübertragung sicherzustellen, muss die Wanne mindestens zu einem Drittel in Wasser eingetaucht sein.
6. **Hybridisierungspuffer vollständig entfernen.**
Hierzu z. B. eine mit einer Vakuumpumpe verbundene Pasteurpipette verwenden.
7. **Jeweils 1 ml vorgewärmte Stringent-Waschlösung (STR, rot) zugeben und Wanne 15 Minuten bei 45°C im Wasserbad/TwinCubator® unter leichtem Schütteln inkubieren.**
8. **Von diesem Schritt an bei Raumtemperatur arbeiten. Stringent-Waschlösung vollständig entfernen.**
Anschließend Flüssigkeitsreste durch Abklopfen der Wanne auf einer saugfähigen Unterlage entfernen. Dies gilt auch für alle anderen Waschschrte.

9. **Membranstreifen einmal 1 Minute mit 1 ml Rinse-Lösung (RIN) unter stetiger Bewegung auf Horizontalschüttler/TwinCubator® waschen (RIN nach Inkubation abschütten).**
10. **1 ml verdünntes Konjugat (s.o.) zu jedem Membranstreifen geben und 30 Minuten auf Horizontalschüttler/TwinCubator® inkubieren.**
11. **Lösung abschütten und jeden Membranstreifen zweimal je 1 Minute mit 1 ml Rinse-Lösung (RIN) und einmal mit ca. 1 ml destilliertem Wasser (z. B. Spritzflasche verwenden) auf Horizontalschüttler/TwinCubator® waschen (Lösung jeweils abschütten).**
Nach dem letzten Waschschrift Wasser möglichst vollständig entfernen.
12. **Je 1 ml verdünntes Substrat (s.o.) zu jedem Membranstreifen geben und lichtgeschützt ohne Schütteln inkubieren.**
In Abhängigkeit von den Testbedingungen (z. B. der Raumtemperatur) kann die Substratinkubationszeit zwischen 3 und 20 Minuten variieren. Eine zu lang andauernde Substratinkubation führt zu einer Verstärkung der Hintergrundfärbung und kann die Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen.
13. **Substratreaktion durch zweimaliges kurzes Waschen mit destilliertem Wasser stoppen.**
14. **Membranstreifen mit einer Pinzette aus den Kavitäten nehmen und zum Trocknen auf saugfähiges Papier legen.**

Auswertung und Interpretation der Ergebnisse

Die Membranstreifen nach dem Trocknen auf eine geeignete Unterlage kleben und lichtgeschützt aufbewahren. Ein Auswertungsbogen liegt dem Kit bei. Wenn dieser Auswertungsbogen verwendet wird, die entwickelten Membranstreifen in die dafür vorgesehenen Felder kleben; dabei die Banden CC und AC an den entsprechenden Hilfslinien ausrichten. Die Resistenz bestimmen und in der entsprechenden Spalte vermerken; als Interpretationshilfe sind im nachfolgenden Kapitel einige Auswertungsbeispiele aufgeführt. Als Auswertehilfe liegt dem Kit außerdem eine Schablone bei, die ebenfalls an den Banden CC und AC des Membranstreifens ausgerichtet werden muss. Insgesamt sind auf dem Membranstreifen 22 Reaktionszonen vorhanden (s. Abbildung).



Hinweis: Der Membranstreifen entspricht nicht der Originalgröße.

Nicht alle Banden eines Membranstreifens müssen die gleiche Signalstärke aufweisen.

Konjugatkontrolle (CC)

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

Amplifikationskontrolle (AC)

Das bei korrekter Durchführung während der Amplifikation entstehende Kontroll-Produkt bindet an die Amplifikationskontrollzone. Ist die Bande entwickelt, kann das Vorhandensein von Hemmstoffen sowie Fehler bei Ansatz und Durchführung der Amplifikationsreaktion ausgeschlossen werden. Bei einem positiven Testergebnis kann das Signal der Amplifikationskontrollzone aufgrund von Kompetitionsreaktionen während der Amplifikation abgeschwächt sein und im Extremfall sogar ganz verschwinden. Der Test ist in diesem Falle jedoch ordnungsgemäß durchgeführt worden und eine Wiederholung nicht erforderlich.

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

M. tuberculosis-Komplex (TUB)

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

Locuskontrollen (gyrA, rrs, embB)

Die Locuskontrollzonen erfassen einen für den jeweiligen Locus spezifischen Genbereich und müssen daher immer ein positives Signal zeigen. Sind weder die Locuskontroll-Sonde noch die entsprechenden Wildtyp- und Mutationssonden eines Gens entwickelt, ist der Test nicht auswertbar.

Wildtypsonden

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

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

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

Jedes Bandenmuster, das von dem Wildtyp-Bandenmuster abweicht, liefert einen Hinweis auf eine Resistenz des untersuchten Stamms. Das *gyrA*-Bandenmuster erlaubt eine Aussage über eine Fluorchinolon-Resistenz (z.B. gegen Ofloxacin oder Moxifloxacin) des entsprechenden Stamms, das *rrs*-Bandenmuster über eine Aminoglycosid (z.B. Capreomycin oder Viomycin)/zyklische Peptid (z.B. Kanamycin oder Amikacin)-Resistenz und das *embB*-Bandenmuster über eine Ethambutol-Resistenz.

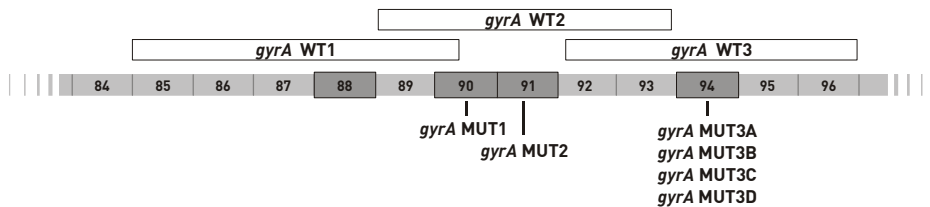


Abbildung 1: Fluorchinolon-Resistenzregion des *gyrA*-Gens
gyrA WT1-3 *gyrA*-Wildtypsonden; *gyrA* MUT1-3: *gyrA*-Mutationssonden. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen (Codons) an, in denen die in der Tabelle aufgeführten Mutationen vorliegen. Die Codons, für die Mutationssonden entwickelt wurden, sind jeweils hervorgehoben.

Mutationssonden

Die verschiedenen Mutationssonden detektieren einige häufig vorkommende Mutationen (s. Tab. 1, 2 und 3).

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

Jedes Bandenmuster, das von dem Wildtyp-Bandenmuster abweicht, liefert einen Hinweis auf eine Resistenz des untersuchten Stamms. Das *gyrA*-Bandenmuster erlaubt eine Aussage über eine Fluorchinolon-Resistenz (z.B. gegen Ofloxacin oder Moxifloxacin) des entsprechenden Stamms, das *rrs*-Bandenmuster über eine Aminoglycosid (z.B. Capreomycin oder Viomycin)/zyklische Peptid (z.B. Kanamycin oder Amikacin)-Resistenz und das *embB*-Bandenmuster über eine Ethambutol-Resistenz.

Folgende Sonderfälle sind zu beachten:

1. Es besteht die Möglichkeit, dass die getestete Probe einen Stamm enthält, der eine Heteroresistenz trägt. Beim Vorliegen einer Heteroresistenz können in dem Stamm gleichzeitig eine mutierte und eine nicht mutierte Sequenz nachgewiesen werden, so dass sowohl eine der Mutationsbanden als auch die zugehörige Wildtypbande auf dem Streifen entwickelt ist. Ob die entsprechende Resistenz auch phänotypisch ausgeprägt ist, hängt vom Konzentrationsverhältnis zwischen mutierter und nicht mutierter Sequenz zum Zeitpunkt der Untersuchung ab.
2. Es besteht die Möglichkeit, dass die getestete Probe mehr als einen *M. tuberculosis*-Komplex-Stamm (durch Mischkultur oder Kontamination) enthält. Weist von diesen mindestens einer eine Mutation auf, kann sowohl eine der Mutationsbanden als auch die zugehörige Wildtyp-Bande entwickelt sein. Ob die entsprechende Resistenz auch phänotypisch nachweisbar ist, hängt vom Konzentrationsverhältnis zwischen resistentem und sensiblen Stamm zum Zeitpunkt der Untersuchung ab.

Tabelle 1: Mutationen im *gyrA*-Gen und die korrespondierenden Wildtyp- und Mutationssonden
(nach Cheng *et al.* 2004, Aubry *et al.* 2006, Matrat *et al.* 2006 und Kocagöz *et al.* 1996)

entfallende Wildtypsonde(n)	erfasste Codons	erscheinende Mutationssonde	Mutation	Phänotypische Resistenz* ¹
<i>gyrA</i> WT1	85-90		C88S	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT1	85-90		A88T	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT2	89-93	<i>gyrA</i> MUT1	A90V	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT2	89-93	<i>gyrA</i> MUT2	S91P	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3A	D94A	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3B	D94N	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3B	D94Y	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3C	D94G	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3D	D94H* ²	FLQ ^R

*¹ FLQ: Fluorchinolone wie z.B. Ofloxacin und Moxifloxacin; ^R = Resistenz

*² Diese sehr seltene Mutation wurde bisher nur theoretisch (*in silico*) nachgewiesen. Es besteht daher die Möglichkeit, dass sie *in vitro* nicht nachweisbar ist.

Tabelle 2: Mutationen im *rrs*-Gen und die korrespondierenden Wildtyp- und Mutationssonden
(nach Maus *et al.* (Feb) 2005 und Maus *et al.* (Aug) 2005)

entfallende Wildtypsonde	erfasste Nukleinsäureposition	erscheinende Mutationssonde	Mutation	Phänotypische Resistenz* ³
<i>rrs</i> WT1	1401	<i>rrs</i> MUT1	A1401G	CAP ^R , Vio ^S , AMK ^R , KAN ^R
<i>rrs</i> WT1	1402	-	C1402T	CAP ^R , Vio ^R , AMK ^S , KAN ^R
<i>rrs</i> WT2	1484	<i>rrs</i> MUT2	G1484T	CAP ^R , Vio ^R , KAN ^R , AMK ^R

*³ CAP: Capreomycin, Vio: Viomycin, KAN: Kanamycin, AMK: Amikacin

^R = Resistenz; ^S = Sensitivität

Tabelle 3: Mutationen im *embB*-Gen und die korrespondierenden Wildtyp- und Mutationssonden
(nach Johnson *et al.* 2006 und Plinke *et al.* 2006)

entfallende Wildtypsonde(n)	erfasste Codons	erscheinende Mutationssonde	Mutation	Phänotypische Resistenz* ⁴
<i>embB</i> WT	306	<i>embB</i> MUT1A	M306I* ⁵	EMB ^R
<i>embB</i> WT	306	<i>embB</i> MUT1B	M306V	EMB ^R
<i>embB</i> WT	306		M306I* ⁶	EMB ^R
<i>embB</i> WT	306		M306I* ⁷	EMB ^R

*⁴ EMB: Ethambutol

*⁵ M306I: Basenaustausch an Codon 306: ATG→ATA

*⁶ M306I: Basenaustausch an Codon 306: ATG→ATC

*⁷ M306I: Basenaustausch an Codon 306: ATG→ATT

^R = Resistenz

Auswertungsbeispiele

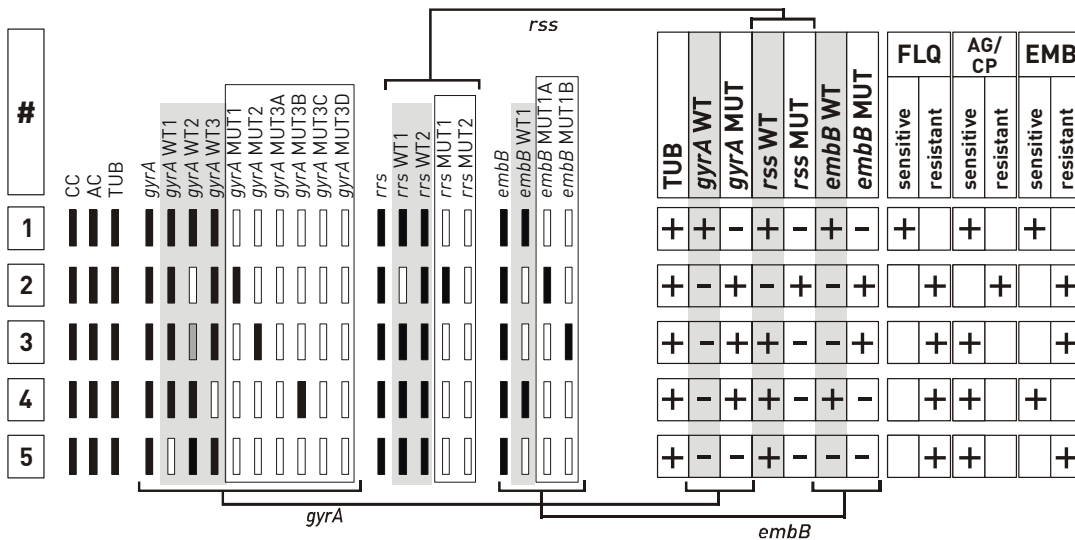


Abbildung 2: Mögliche Bandenmuster und deren Auswertung in Bezug auf eine Fluorchinolon- und/oder Aminoglycosid/zyklische Peptid- und/oder Ethambutol-Resistenz.

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

Im Folgenden werden zwei der oben abgebildeten Beispiele erläutert:

Beispiel 1 zeigt das Wildtyp-Bandenmuster. Da alle Wildtypbanden, aber keine der Mutationsbanden entwickelt sind, ist in der Auswertetabelle für alle drei Gene ein „+“ für WT und ein „-“ für MUT eingetragen. Entsprechend sind die Kästchen „FLQ-sensitive“, „AG/CP-sensitive“ und „EMB-sensitive“ mit einem „+“ versehen.

In Beispiel 5 fehlt eine der *gyrA*-Wildtypbanden und die *embB*-Wildtypbande, daher ist ein „-“ bei „*gyrA* WT“ und bei „*embB* WT“ verzeichnet. Keine der Mutationsbanden ist entwickelt, daher steht auch in diesen Spalten ein „-“. Das *rrs*-Gen entspricht dem Wildtyp-Bandenmuster. Der Stamm ist als FLQ- und EMB-resistent und AG/CP-sensibel ausgewertet.

Grenzen der Methode

Wie bei anderen diagnostischen Tests müssen die Ergebnisse dieses Assays im Zusammenhang mit anderen dem behandelnden Arzt zur Verfügung stehenden Laboraten und klinischen Daten interpretiert werden.

Dieser Test ist nur von Fachpersonal durchzuführen, welches im Testverfahren geschult wurde und mit molekularbiologischen Techniken vertraut ist.

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

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

Vor der Amplifikation muss bakterielle DNA aus Kulturproben oder pulmonalem, mikroskopisch-positivem Direktmaterial mit Hilfe eines geeigneten DNA-Isolierungsverfahrens extrahiert werden. Es muss gewährleistet sein, dass es während der Amplifikation zu einer effizienten Vervielfältigung der Ausgangs-DNA kommt.

Die Leistungsbewertungsprüfung dieses Testsystems wurde mit der HotStarTaq-Polymerase der Fa. Qiagen durchgeführt. Für die DNA-Isolierung aus Kulturproben und Direktmaterial wurde das im Kapitel DNA-Isolierung beschriebene Schnellverfahren verwendet. Da der Test nicht für alle kommerziell erhältlichen Polymerasen bzw. DNA-Isolierungskits validiert werden konnte, muss die Eignung anderer als der hier erwähnten Polymerasen und Isolierungsmethoden vom Anwender selbst validiert werden.

Wie bei jedem Nachweissystem auf DNA-Basis wird mit diesem Test nur die Nukleinsäuresequenz, nicht aber die Aminosäuresequenz überprüft. Daher können Mutationen, die nicht zu einem Aminosäureaustausch und damit zur Ausbildung einer Resistenz führen (sog. stille Mutationen), zu einem Wegfall einer der Wildtyp-Sonden führen.

Theoretisch kann trotz eines angezeigten Wildtyp-Musters eine Resistenz vorliegen. Enthält die getestete Probe zum Zeitpunkt der Untersuchung einen Stamm, der eine Heteroresistenz trägt und bei dem die Resistenz auf eine Mutation zurückgeht, die nicht durch die Mutationssonden erkannt wird, tritt ein Wildtyp-Bandenmuster auf. Enthält die Probe mehr als einen *M. tuberculosis*-Komplex-Stamm (durch Mischkultur oder Kontamination) und weist einer von diesen eine nicht durch die Mutationssonden abgedeckte Mutation auf, tritt ebenfalls ein Wildtyp-Bandenmuster auf.

Mit dem **GenoType® MTBDRsl**-Test werden ausschließlich die Resistenzen des *M. tuberculosis*-Komplexes detektiert, die auf Mutationen in den hier untersuchten *gyrA*-, *rrs*-, und *embB*-Regionen zurückzuführen sind. Resistenzen, die auf Mutationen anderer Gene oder anderer Bereiche der hier betrachteten Gene sowie auf andere Fluorchinolon-, Aminoglycosid/zyklische Peptid- und Ethambutol-Resistenzmechanismen zurückzuführen sind, werden mit diesem Test nicht nachgewiesen.

Resistenz-vermittelnde Mutationen innerhalb der hier betrachteten *gyrA*-, *rrs*-, und *embB*-Genbereiche, die aufgrund ihres sehr seltenen Vorkommens im Zuge der Validierungsstudie nicht mit Patientenproben validiert werden konnten, wurden nur *in silico* nachgewiesen. Ein *in silico*-Nachweis schließt jedoch die theoretische Möglichkeit, dass einige dieser Mutationen *in vitro* nicht detektierbar sind, nicht aus.

Die Angaben zu den in Tabelle 2 aufgeführten Kreuzresistenzen zwischen Capreomycin, Viomycin, Kanamycin und Amikacin, die entsprechend der auftretenden Mutationen variieren, spiegeln den derzeitigen Wissensstand der Firma Hain Lifescience wider und beruhen auf den oben angegebenen Literaturquellen. Neuste Publikationen weisen darauf hin, dass das Auftreten von Mehrfachmutationen in und außerhalb der hier betrachteten Zielsequenzen zur Verstärkung der phänotypischen Resistenzbildung oder zur Verschiebung der hier angegebenen Kreuzresistenzen führen können. Effekte, die durch Mehrfachmutationen außerhalb der Zielsequenzregion hervorgerufen werden, können mit dem Test nicht nachgewiesen werden.

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

Dieser Test und die daraus resultierende Aussage beziehen sich ausschließlich auf die Genomabschnitte, aus denen die spezifischen Sonden ausgewählt wurden. Eine eventuelle Sequenzanalyse bleibt weiterführenden Untersuchungen vorbehalten.

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

Die Leistungsdaten des Assays können unter www.hain-lifescience.de angefragt werden.

Troubleshooting

Durchweg schwache oder gar keine Banden (inkl. Konjugatkontrolle)

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

Schwache oder keine Banden mit Ausnahme der Konjugatkontrolle

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

Inhomogene Färbung

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

Hohe Hintergrundfärbung

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

Unerwartetes Ergebnis

- Falsche Inkubationstemperatur.
- Hybridisierungspuffer und/oder Stringent-Waschlösung nicht ausreichend erwärmt oder nicht ausreichend gemischt.
- Kontamination der isolierten DNA oder der Amplifikationsreagenzien durch zuvor isolierte oder amplifizierte DNA. Bei einer Kontamination der Amplifikationsreagenzien zeigt auch eine mitgeführte Negativ-Kontrollprobe ein entsprechendes Bandenmuster.
- Kontamination benachbarter Kavitäten während der Zugabe von Hybridisierungspuffer.
- In Abhängigkeit der Menge an eingesetzter amplifizierter DNA und den speziellen Reaktionsbedingungen kann es zu einer starken und schnellen Farbreaktion kommen. In solchen Fällen die Substratinkubation abbrechen, sobald die Banden gut sichtbar sind, da es sonst zu falsch-positiven Farbreaktionen kommen kann.
- Keine Reinkultur als Ausgangsmaterial oder mehr als eine Mutation im getesteten Stamm.
- Stille Mutation im Sondenbereich (s. Kapitel Grenzen der Methode).

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

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

Bestandteile des Kits

Gelieferte Menge

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

GenoType® MTBDRsl

Molecular Genetic Assay for Identification of Resistances to Fluoroquinolones, Aminoglycosides/Cyclic Peptides and Ethambutol of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex

Methodology

The GenoType® MTBDRsl test is based on the DNA•STRIP® technology and permits the molecular genetic identification of the *M. tuberculosis* complex and its resistance to fluoroquinolones (e.g. ofloxacin and moxifloxacin) and/or aminoglycosides/cyclic peptides (injectable antibiotics as capreomycin, viomycin/kanamycin, amikacin) and/or ethambutol from cultivated samples or pulmonary smear-positive clinical specimens. The identification of resistance to fluoroquinolones is enabled by the detection of the most significant mutations of the *gyrA* gene (coding for DNA gyrase). For detection of resistance to aminoglycosides/cyclic peptides, the 16S rRNA gene (*rrs*) and for detection of resistance to ethambutol the *embB* gene (which, together with the genes *embA* and *embC*, codes for arabinosyl transferase) are examined.

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

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

Storage and Precautions

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

Patient specimens and cultures made from patient specimens must always be considered as potentially infectious. Samples from risk patients and cultures made from those samples must always be labeled and handled under suitable safety conditions. Observe all federal, state, and local safety and environmental regulations. Always wear suitable protective clothing and gloves. Specimen treatment and sample preparation up to and including the heat inactivation step must be carried out in a class II safety cabinet. Before the heat inactivation step, samples must be centrifuged in an aerosol-tight rotor. Open aerosol-tight rotor in safety cabinet only. After heat inactivation, a standard rotor can be used for spinning the samples outside the safety cabinet. Observe the usual precautions for amplification set-up. It is essential that all reagents and materials used for DNA extraction and amplification set-up are free from DNases.

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

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

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

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

Quality Control

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

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

DNA Extraction

Bacteria grown on solid medium (e. g. Loewenstein-Jensen, Middlebrook) or in liquid medium (e. g. BACTEC, MB-Check) may be used, as well as smear-positive clinical specimens (pulmonary samples). The test must not be used to detect mycobacteria directly from smear-negative patient specimens. The working area must be free from amplified DNA. It is crucial to heat samples to 95°C for at least 20 min in order to inactivate vegetative bacteria. Any DNA extraction procedure producing amplifiable DNA from bacteria can be used. The following quick protocol normally yields DNA suitable for amplification:

- 1a. When using bacteria grown on solid medium, collect bacteria with an inoculation loop and suspend in approximately 300 µl of water (molecular biology grade).
- 1b. When using bacteria grown in liquid media, directly apply 1 ml, when using clinical specimens, apply 500 µl of a decontaminated* sample. Pellet bacteria by spinning for 15 min in a standard table top centrifuge with an aerosol-tight rotor in a class II safety cabinet at approximately 10000 x g. Discard supernatant and resuspend bacteria in 100-300 µl of water (for culture samples), or 100 µl of water (for clinical specimens) by vortexing.
2. Incubate bacteria from 1a or 1b for 20 min at 95°C in a water bath.
3. Incubate for 15 min in an ultrasonic bath (for cultured material this step is optional).
4. Spin down for 5 min at full speed and directly use 5 µl of the supernatant for PCR. In case DNA solution is to be stored for an extended time period, transfer supernatant to a new tube.

* Samples must be processed using the NALC/NaOH method according to the CDC publication "Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory".

Detailed protocols can be requested from your local distributor or through: www.hain-lifescience.com

Amplification

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

Per tube mix:

- 35 µl PNM – provided
- 5 µl 10x polymerase incubation buffer – not provided
- x µl MgCl₂ solution¹¹ – not provided
- 1-2 unit(s) thermostable DNA polymerase (refer to manual) – not provided
- y µl water to obtain a volume of 45 µl (not considering volume of enzyme) – not provided
- Add 5 µl DNA solution leading to a final volume of 50 µl (not considering volume of enzyme).

¹¹ Depending on the enzyme/buffer system used, the optimal MgCl₂ concentration may vary between 1.5 and 2.5 mM. Please note that some incubation buffers already contain MgCl₂.

The performance evaluation of the **GenoType® MTBDRsI** assay was carried out using the HotStarTaq DNA Polymerase from Qiagen. When using this enzyme, the following amounts are required per sample:

- 35 µl PNM – provided
- 5 µl 10x PCR Buffer for HotStarTaq (contains 15 mM MgCl₂) – not provided
- 2 µl 25 mM MgCl₂ solution – not provided
- 0.2 µl (1 U) HotStarTaq – not provided
- 3 µl water (molecular biology grade) – not provided
- 5 µl DNA solution (add in a separated area)

The final MgCl₂ concentration in this amplification mix is 2.5 mM.

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

Amplification profile²¹:

		culture samples	clinical specimens
15 min	95°C	1 cycle	1 cycle
30 sec	95°C	} 10 cycles	10 cycles
2 min	58°C		
25 sec	95°C	} 20 cycles	30 cycles
40 sec	53°C		
40 sec	70°C		
8 min	70°C	1 cycle	1 cycle

²¹ Applies to the Taq polymerase used for validation. When using other hot start DNA polymerases, the time interval of the first step might have to be reduced (please refer to manual of the enzyme).

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

For checking the amplification reaction, 5 µl of each sample might be directly applied to a 2% agarose gel without the addition of loading buffer. The amplicons have a length of approximately 63 bp (Amplification Control), 115 bp (*M. tuberculosis* complex), 123 bp (*gyrA*), 263 bp (*rrs*), and 138 bp (*embB*), respectively.

Hybridization

Preparation

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

1. **Dispense 20 µl of Denaturation Solution (DEN, blue) in a corner of each of the wells used.**

2. **Add to the solution 20 µl of amplified sample, pipette up and down to mix well and incubate at room temperature for 5 minutes.**

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

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

Take care not to spill solution into the neighboring wells.

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

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

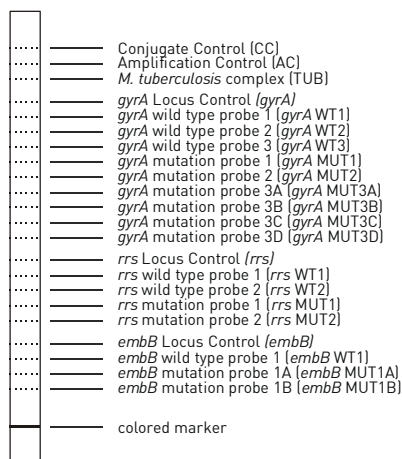
Depending on the test conditions (e. g. room temperature), the substrate incubation time can vary between 3 and 20 minutes. Extended substrate incubation times can lead to increased background staining and might impair interpretation of the results.

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

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

Evaluation and Interpretation of Results

Paste strips and store protected from light. An evaluation sheet is provided with the kit. When using this evaluation sheet, paste the developed strips in the designated fields by aligning the bands CC and AC with the respective lines on the sheet. Determine the resistance status and note down in the respective column; as an help for interpretation, evaluation examples are given in the subsequent chapter. The supplied template also serves as an aid for evaluation and must be aligned with the bands CC and AC of the strip as well. Each strip has a total of 22 reaction zones (see figure).



Note: The strip is not displayed in original size.

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

Conjugate Control (CC)

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

Amplification Control (AC)

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

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

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

M. tuberculosis complex (TUB)

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

Locus Controls (*gyrA*, *rrs* and *embB*)

The Locus Control zones detect a gene region specific for the respective locus and must always stain positive. If neither the Locus Control probe nor the Wild type or Mutation probes of one of the three genes examined are developed, the test can not be evaluated.

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. Hence, the strain tested is sensitive for the respective antibiotics.

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

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

Each pattern deviating from the wild type pattern indicates a resistance of the tested strain. The banding pattern obtained with the *gyrA* probes allows to draw a conclusion about a resistance to fluoroquinolones (e.g. ofloxacin or moxifloxacin), the banding pattern obtained with the *rrs* probes allows to draw a conclusion about a resistance to aminoglycosides (e.g. capreomycin or viomycin)/cyclic peptides (e.g. kanamycin or amikacin) and the banding pattern obtained with the *embB* probes allows to draw a conclusion about a resistance to ethambutol of the strain tested.

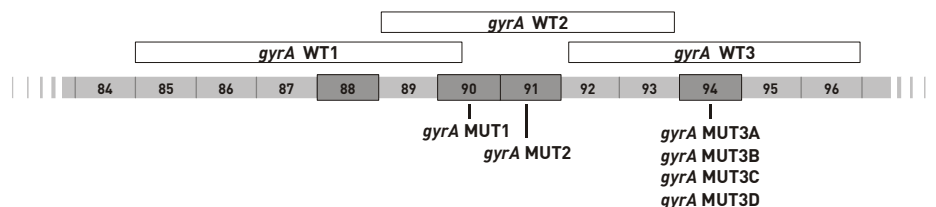


Fig. 1: Fluoroquinolone resistance region of the *gyrA* gene

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

Mutation probes

The mutation probes detect some of the most common resistance mediating mutations [see table 1, 2, and 3].

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

Each pattern deviating from the wild type pattern indicates resistance of the tested strain. The banding pattern obtained with the *gyrA* probes allows to draw a conclusion about a resistance to fluoroquinolones (e.g. ofloxacin or moxifloxacin), the banding pattern obtained with the *rrs* probes allows to draw a conclusion about a resistance to aminoglycosides (e.g. capreomycin or viomycin)/cyclic peptides (e.g. kanamycin or amikacin) and the banding pattern obtained with the *embB* probes allows to draw a conclusion about a resistance to ethambutol of the strain tested.

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 sample; 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 non-mutated 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.

Table 1: Mutations in the gene *gyrA* and the corresponding wild type and mutation probes

(according to Cheng *et al.* 2004, Aubry *et al.* 2006, Matrat *et al.* 2006 and Kocagöz *et al.* 1996)

failing wild type probe(s)	codons analyzed	mutation probe	mutation	phenotypic resistance* ¹
<i>gyrA</i> WT1	85-90		C88S	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT1	85-90		A88T	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT2	89-93	<i>gyrA</i> MUT1	A90V	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT2	89-93	<i>gyrA</i> MUT2	S91P	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3A	D94A	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3B	D94N	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3B	D94Y	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3C	D94G	FLQ ^R
<i>gyrA</i> WT3	92-97	<i>gyrA</i> MUT3D	D94H* ²	FLQ ^R

*¹ FLQ: fluoroquinolones (e.g. ofloxacin and moxifloxacin); ^R = resistance

*² This rare mutation has only been detected theoretically (*in silico*) yet. It is therefore possible that it cannot be detected *in vitro*.

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

(according to Maus *et al.* (Feb) 2005 and Maus *et al.* (Aug) 2005)

failing wild type probe(s)	codons analyzed	mutation probe	mutation	phenotypic resistance* ³
<i>rrs</i> WT1	1401	<i>rrs</i> MUT1	A1401G	CAP ^R , Vio ^S , AMK ^R , KAN ^R
<i>rrs</i> WT1	1402	-	C1402T	CAP ^R , Vio ^R , AMK ^S , KAN ^R
<i>rrs</i> WT2	1484	<i>rrs</i> MUT2	G1484T	CAP ^R , Vio ^R , KAN ^R , AMK ^R

*³ CAP: capreomycin, Vio: viomycin, KAN: kanamycin, AMK: amikacin

^R = resistance; ^S = sensitivity

Table 3: Mutations in the gene *embB* and the corresponding wild type and mutation probes (according to Johnson *et al.* 2006 and Plinke *et al.* 2006)

failing wild type probe(s)	codons analyzed	mutation probe	mutation	phenotypic resistance ^{*4}
<i>embB</i> WT	306	<i>embB</i> MUT1A	M306I ^{*5}	EMB ^R
<i>embB</i> WT	306	<i>embB</i> MUT1B	M306V	EMB ^R
<i>embB</i> WT	306	-	M306I ^{*6}	EMB ^R
<i>embB</i> WT	306	-	M306I ^{*7}	EMB ^R

^{*4} EMB: ethambutol

^{*5} M306I: base exchange at codon 306: ATG→ATA

^{*6} M306I: base exchange at codon 306: ATG→ATC

^{*7} M306I: base exchange at codon 306: ATG→ATT

^R = resistance

Evaluation Examples

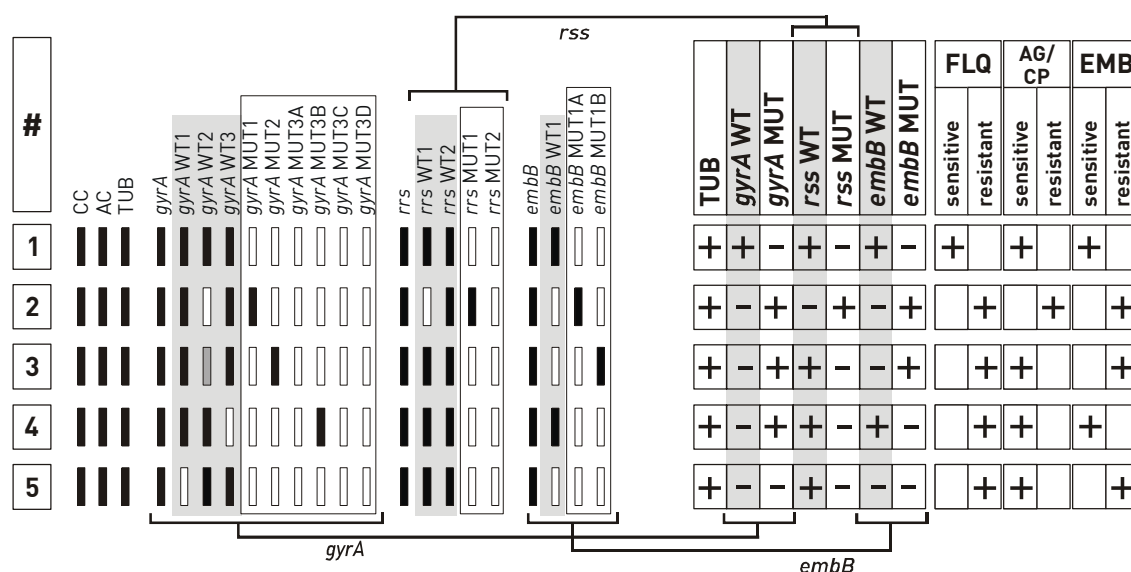


Figure 2: Examples for banding patterns and their evaluation with respect to resistances to fluoroquinolones and/or aminoglycosides/cyclic peptides and/or ethambutol

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 display a coloration. If at least one of the mutation bands display 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 "FLQ-sensitive", "AP/CP-sensitive" and "EMB-sensitive" are marked with a "+".

In example 5, one of the *gyrA* wild type probes and the *embB* wild type probe are missing. Hence, the boxes "*gyrA* WT" and "*embB* WT" are marked with a "-". As none of the mutation probes are developed, these boxes are also marked with a "-". The *rrs* gene shows the wild type pattern. The strain is evaluated as FLQ- and EMB-resistant and AG/CP-sensitive.

Limitations

As with other diagnostic assays, the results of this test may only be interpreted in combination with additional laboratory and clinical data available to the responsible physician.

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

The statements given in this manual concerning the capacities of the method refer to culture samples and pulmonary smear-positive clinical specimens.

The available data about extrapulmonary smear-positive clinical specimens is not sufficient to draw a conclusion about their applicability.

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

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

Performance evaluation of this assay was carried out using the HotStarTaq polymerase from Qiagen (Hilden, Germany). For DNA isolation from culture samples and clinical specimens the quick protocol described in chapter DNA Extraction was applied. Since the performance characteristics of this assay have not been validated for all polymerases and DNA isolation kits commercially available, the user is in charge of validating the applicability of polymerases or isolation methods other than those mentioned above.

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

Theoretically, a resistance can exist in spite of a wild type pattern. If, at investigation, the sample contains a strain that has developed a heteroresistance and the resistance of which is due to 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 appear also.

The **GenoType® MTBDRsl** test only detects those resistances of the *M. tuberculosis* complex that have their origins in the *gyrA*, *rrs* and *embB* gene regions examined here. Resistances originating from mutations of other genes or gene regions as well as other resistance mechanisms against fluoroquinolones, aminoglycosides/cyclic peptides or ethambutol will not be detected by this test.

Resistance-mediating mutations within the *gyrA*, *rrs* and *embB* gene regions examined here which, due to their rareness, were not accessible for validation via patient samples, were only "detected" *in silico*. An *in silico* detection, however, does not exclude the possibility that some of these mutations cannot be detected *in vitro*.

The data given in table 2 regarding the cross-resistances between capreomycin, viomycin, kanamycin, and amikacin which vary depending on the mutations present, reflect the state of knowledge of Hain Lifescience and are based on the literature cited above. Recent data indicate that multiple mutations within and outside the sequences investigated with this assay may boost the intensity of phenotypic resistance or may shift the cross-resistances described above. Please note that effects due to multiple mutations outside the investigated sequences cannot be detected by this test.

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

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

As with 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 sub-types might not be detected. The test reflects the state of knowledge of Hain Lifescience.

Performance data of the assay can be requested through: www.hain-lifescience.com

Troubleshooting

Overall weak or no signals (including Conjugate Control zone)

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

Weak or no signals except for Conjugate Control zone

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

No homogeneous staining

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

High background color

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

Unexpected result

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

Material Required but not Provided

- Absorbent paper
- Adjustable pipettes for 10, 20, 200, and 1000 µl
- Calibrated thermometer
- Disposable gloves
- Disposable sterile pipette tips with filter
- DNA extraction reagents for amplification use as well as necessary equipment
- Graduated cylinder
- PCR tubes, DNase and RNase free
- Shaking platform/**TwinCubator®**
- Shaking water bath/**TwinCubator®**
- Thermal cycler
(heating rate: 3°C/sec, cooling rate: 2°C/sec, precision: +/-0.2°C)
- Thermostable DNA polymerase with buffer (recommendation: hot start enzyme, extension rate: 2-4 kb/min at 72°C, half-life: 10 min at 97°C, 60 min at 94°C, amplification efficiency: >10⁵ fold)
- Timer
- Tweezers
- Water (molecular biology grade)
- Water bath

Kit Contents

Supplied

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

