



Loopamp™ MTBC Detection Kit

VERWENDUNGSZWECK

Das Loopamp™ MTBC Detection Kit ist ein qualitativer *In-vitro*-Diagnostiktest zum Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (MTBC)-DNA aus dem Sputum von Patienten mit Symptomen, die auf eine MTBC-Infektion hinweisen. Das Kit hilft bei der Diagnose einer MTBC-Infektion und ist für die Verwendung in professionellen Labors und Krankenhäusern durch entsprechend geschultes Personal vorgesehen. Das Ergebnis kann entweder mit einem automatischen Turbidimeter oder optisch unter UV-Bestrahlung interpretiert werden.

TESTPRINZIP

Dieses Produkt basiert auf dem von der Eiken Chemical Co., Ltd. entwickelten Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren „Loop-mediated isothermal amplification“ (LAMP).

Die LAMP-Methode zeichnet sich durch folgende Merkmale aus: (1) Es wird nur ein Enzym benötigt und die Amplifikationsreaktion läuft unter isothermen Bedingungen ab.^(1,2) (2) Sie hat eine extrem hohe Spezifität aufgrund der Verwendung von vier Primern, die sechs verschiedene Regionen auf der Ziel-DNA erkennen. (3) Sie hat eine hohe Amplifikationseffizienz und kann in kurzer Zeit eine hohe Konzentration an Amplifikat erzeugen, was einen optischen oder automatischen Nachweis ermöglicht.^(3,4)

Die mit diesem Produkt gelieferten Primer wurden in der Gyrase-Untereinheit B (*gyrB*) und der Insertionssequenz *IS6110* (IS) Region der MTBC-Genom-DNA entwickelt, die durch die Alignment-Analyse der ausgewählten Basensequenzen von MTBC und nichttuberkulösen Mykobakterien als gut konservierte Basensequenz in MTBC bestätigt wurde.

Die DNA aus unbehandeltem Sputum oder NALC-NaOH-behandeltem Sputum wird mit dem Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit (separat erhältlich) extrahiert. Dann wird die DNA-Lösung in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die strangversetzende DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), Calcein, Reaktionspuffer und MTBC-spezifische Primer werden in getrockneter Form in der Verschlusskappe des Reaktionsgefäßes aufbewahrt. Dieses getrocknete LAMP-Reagenz (MTBC-Nachweisreagenz (dMTB)) löst sich auf, wenn die DNA-Lösung hinzugefügt wird. Das Reaktionsgefäß wird dann bei 67,0 °C inkubiert und die DNA wird durch die Katalyse der strangversetzenden DNA-Polymerase in der LAMP-Reaktion amplifiziert.

Der Nachweis der Amplifikate basiert auf der Trübungsmessung eines Nebenprodukts, Magnesiumpyrophosphat (weißes Präzipitat).⁽³⁾ Alternativ kann anstelle der Trübungsmessung auch eine optische Beurteilung unter UV-Bestrahlung durchgeführt werden. Vor der Reaktion befindet sich das Calcein im Reagenz in einem gehemmten Zustand, da Manganionen daran gebunden sind. Sobald die LAMP-Reaktion jedoch beginnt, werden Pyrophosphationen gebildet, die die Manganionen binden, und das Calcein wird fluoreszierend.⁽⁴⁾

KITBESTANDTEILE

Die Reagenzien sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum haltbar, vorausgesetzt, der Behälter bleibt ungeöffnet bei einer Lagertemperatur von 2–30 °C. Bei Beachtung dieser Verfahrensanweisungen sind die Reagenzien auch nach dem Öffnen des Behälters stabil.

MTBC-Nachweisreagenz 2 x 48 Röhrchen

Die folgenden Reagenzien in getrockneter Form sind in jedem Reaktionsgefäß enthalten.

Bst DNA-Polymerase^{a)}
Desoxyribonukleosidtriphosphate
Magnesiumsulfat
Calcein
Manganchlorid
Primer^{b)}

Positivkontrolle MTB (PC MTB)^{c)} 1 x 0,4 mL

Negativkontrolle MTB (NC MTB) 3 x 0,5 mL
30 µL Tropfer 1 x 18 Tropfer

- a) Die aus *Geobacillus stearothermophilus* stammende *Bst* DNA-Polymerase ist eine strangversetzende DNA-Polymerase ohne 5'→3'-Exonukleaseaktivität.
- b) Primer, die in der *gyrB*- und IS-Region der MTBC-Genom-DNA entwickelt wurden, die durch HPLC von synthetisierten Oligonukleotiden gereinigt wurden.
- c) PC MTB enthält ein Produkt, das aus der *In-vitro*-Amplifikation einer Template-Genom-DNA von *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank Nr. NC_000962) stammt.

Die Abkürzungen der folgenden Reagenzien und die Chargennummer sowie der Hersteller (EKN) sind wie unten gezeigt auf den Behältern aufgedruckt:

Reagenzien	Beschriftung am Röhrchen	Deckelcode
Positivkontrolle MTB	PC MTB Lot No., EKN	PC MTB
Negativkontrolle MTB	NC MTB Lot No., EKN	NC MTB

Informationen zur Metrologischen Rückverfolgbarkeit

Die Positivkontrolle stammt aus dem Amplifikationsprodukt genomischer DNA von *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank Nr. NC_000962). Die spezifische Region von *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, die Region von Interesse, dient als Vorlage für die Amplifikation des PC-MTBDNA-Fragments. Dieses Fragment wird durch photospektrometrische Analyse quantifiziert und die DNA-Konzentration von PC MTB wird auf 1000 Kopien/µl eingestellt.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- (1) Nur zum Gebrauch in der *In-vitro*-Diagnostik.
- (2) Dieses Produkt ist für die klinische Diagnose von MTBC anhand von Sputumproben menschlichen Ursprungs vorgesehen. Nicht für andere Zwecke verwenden.
- (3) Bei Verwendung dieses Produkts immer diese Gebrauchsanweisung beachten.
- (4) Reagenzien nicht einfrieren.
- (5) Keine abgelaufenen Reagenzien verwenden.
- (6) Verschiedene Chargen nicht mischen.
- (7) Reagenzien nicht nachfüllen.
- (8) Die Leistung des Loopamp™ MTBC Detection Kit hängt von der Kompetenz des Anwenders und der Einhaltung der Verfahrensanweisungen ab. Die Tests sollten von entsprechend geschultem Personal unter strikter Einhaltung der mitgelieferten Anweisungen durchgeführt werden.
- (9) Kurz vor Verwendung die erforderliche Anzahl Reaktionsgefäße aus der Verpackung entnehmen und den Aluminiumbeutel sofort wieder verschließen.
- (10) Trockenmittel im Aluminiumbeutel belassen. Hohe Feuchtigkeit kann das getrocknete LAMP-Reagenz in den Reaktionsgefäßen zersetzen.
- (11) Hitze, Feuchtigkeit und Licht können das dMTB beschädigen. Daher nur die erforderliche Anzahl Reaktionsgefäße (Anzahl Proben + Anzahl Kontrollen) entnehmen und den Aluminiumbeutel sofort wieder verschließen.
- (12) Benutzerhandbuch lesen und vor Beginn des Verfahrens vergewissern, dass die erforderliche Ausrüstung (Turbidimeter oder Inkubator) verfügbar ist.
- (13) Sputumproben stellen ein potenzielles Infektionsrisiko dar. Alle notwendigen Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung von Biogefährdung treffen.⁽⁵⁾
- (14) PC MTB und NC MTB enthalten geringe Mengen an Natriumazid als Konservierungsmittel. Da Natriumazid als giftig eingestuft ist, jeglichen Kontakt mit Augen, Mund oder Haut vermeiden.
- (15) Bei versehentlichem Kontakt von Reagenzien mit Augen, Mund oder Haut die betroffene Stelle sofort mit reichlich Wasser abspülen und, falls notwendig, einen Arzt konsultieren.
- (16) PC MTB nicht diluieren oder den Proben beifügen. Stattdessen PC MTB nur wie in dieser Packungsbeilage beschrieben verwenden, um eine DNA-Kontamination zu vermeiden.
- (17) PC MTB und alle positiven Sputumproben getrennt von den anderen Kit-Reagenzien aufbewahren.

- (18) Die Verschlusskappe jedes Reaktionsgefäßes enthält das dMTB in getrockneter Form. Verschlusssinnenseite nicht berühren.
- (19) Reaktionsgefäße vor Verwendung sorgfältig auf Risse oder Kratzer prüfen. Beschädigte Gefäße können falsche Ergebnisse liefern und zu DNA-Kontamination von Inkubator und Arbeitsbereich führen.
- (20) Reaktionsgefäße vor Ende der LAMP-Reaktion keinem UV-Licht aussetzen. Längere UV-Lichtbestrahlung kann die Gefäße beschädigen und zu falschen Ergebnissen führen.
- (21) Bei Verwendung von UV-Licht für die optische Fluoreszenzbeurteilung nicht direkt in die UV-Lichtquelle schauen. Schon ein kurzer Blick in das UV-Licht kann die Augen reizen und konjunktivitisähnliche Symptome hervorrufen. Bei direktem Blickkontakt mit dem UV-Licht sollte eine Glasscheibe verwendet oder eine Schutzbrille bzw. Augenmaske getragen werden.
- (22) Im Benutzerhandbuch des Inkubators nachschlagen. Bei Verwendung von HumaLoop T oder Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A die Reaktionsgefäße vorsichtig aus dem Inkubator entnehmen, um Verbrennungen zu vermeiden.

ABFALLENTSORGUNG

- (1) Röhrchen nicht nach der DNA-Amplifikation öffnen. Verschlusskappe geschlossen halten und benutzte Röhrchen als medizinische Abfälle mittels Verbrennung oder doppelt verpackt in verschließbaren Plastikbeuteln entsorgen.
- (2) Reaktionsgefäße niemals autoklavieren oder wiederverwenden, da anderenfalls Amplifikate dispergieren und zu Kontamination führen würden.
- (3) Das Hauptmaterial der Reaktionsgefäße und Reagenzröhrchen ist PP, des Reaktionsgefäßhalters PET, des Aluminiumbeutels Aluminium und des Kit-Koffers Papier.
- (4) Gebrauchte Reagenzien, Behälter oder Laborutensilien gemäß lokalen Vorschriften entsorgen.

PROBENAHEME

- (1) Den purulentesten Teil der Sputumprobe verwenden.
- (2) Sputumproben sollten sofort nach der Entnahme verwendet werden.
- (3) Sputum in einem vom LAMP-Amplifikationsraum getrennten Raum entnehmen. Aerosole, die die MTBC-DNA enthalten, können bei der Sputumentnahme entstehen und eine Kontamination verursachen.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, NICHT IM KIT ENTHALTEN

- Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit
- Pipette-60 Set

Für optischen Fluoreszenznachweis

(Für HumaLoop T)

- HumaLoop T

(Für anderen Inkubator mit UV-Licht)

- Inkubator (Temperaturgenauigkeit: $\pm 0,5$ °C; mit heißer Haube)
- HumaHeat oder ein anderer Thermoblock
- UV-Licht oder blaues LED-Licht (Wellenlänge: 240–260 nm und 350–370 nm)
- Schutzbrille oder eine UV-blockierende Augenmaske (optional)

Für Echtzeit-Trübungsmessung

- HumaTurb C+A
- HumaHeat oder ein anderer Thermoblock

Zum Mischen von Reagenzien und Proben

- Zentrifuge für Mikroreaktionsgefäße (optional)
- Zentrifuge für acht verbundene Röhrchen (optional)
- HuMax ITA, Mikrozentrifuge (optional)

REAGENZVORBEREITUNG

(1) MTBC-Nachweisreagenz

Die erforderliche Anzahl von Röhrchen aus dem Aluminiumbeutel entnehmen und auf das Gestell legen. (Summe der Proben und Kontrollen).

Hinweis: Nach Entnahme der benötigten Röhrchen den Aluminiumbeutel mit den unbenutzten Röhrchen sofort wieder verschließen.

(2) Negativkontrolle MTB (NC MTB)

Röhrchen anschnippen (oder abzentrifugieren), um den Inhalt auf dem Boden des Röhrchens zu sammeln. 60 µL der NC MTB in das Heizgefäß pipettieren, das im Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit enthalten ist. Zur Verarbeitung der NC MTB die Gebrauchsanweisung beachten (im Folgenden wird extrahierte NC MTB als „Negativkontrolllösung“ bezeichnet).

Hinweis: Eine Negativkontrolle sollte jedes Mal enthalten sein.

(3) Positivkontrolle MTB (PC MTB)

Röhrchen anschnippen (oder abzentrifugieren), um den Inhalt auf dem Boden des Röhrchens zu sammeln.

Hinweis: Die PC MTB sollte jedes Mal gemessen werden.

MESSVERFAHREN

DNA-Extraktion

Zur Extraktion der DNA aus 60 µL Sputumprobe die Anweisungen für das Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit (separat erhältlich) befolgen. 60 µL der Sputumprobe in das Heizgefäß geben und in den HumaHeat oder den auf 90 °C vorgeheizten Thermoblock legen. Wann immer möglich, das purulenteste Sputum verwenden.

Reagenzien- und Probenmischung

- (1) HumaLoop T oder Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A einschalten.

- (2) 30 µL der Probenlösung unter Verwendung des Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit in ein Reaktionsgefäß geben und die Verschlusskappe schließen.

Hinweis: Das Volumen zwischen den beiden Linien auf dem Reaktionsgefäß entspricht ca. 30 µL.

- (3) 30 µL der Negativkontrolllösung unter Verwendung des Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit in ein Reaktionsgefäß geben und die Verschlusskappe schließen.

Hinweise: Das Volumen zwischen den beiden Linien auf dem Reaktionsgefäß entspricht ca. 30 µL.

- (4) 30 µL der PC MTB mit dem mitgelieferten Tropfer in ein Reaktionsgefäß geben und Verschlusskappe schließen.

- (5) Alle Gefäße anschnippen (oder abzentrifugieren), um die Lösung auf dem Boden der Gefäße aufzufangen.

Hinweis: Nur wenn sich der Flüssigkeitsstand mittig der beiden Linien auf einem Reaktionsgefäß befindet, wurden 30 µL pipettiert.

- (6) Die getrockneten Reagenzien durch Umdrehen der Reaktionsgefäße und Sammeln der DNA-Lösung in der Verschlusskappe rekonstituieren. Zur Rekonstitution der getrockneten Reagenzien die Reaktionsgefäße 2 Minuten verkehrt herum lagern.

- (7) Zum Mischen des Inhalts die Reaktionsgefäße fünfmal drehen. Vollständige Dilution der getrockneten Reagenzien in der Verschlusskappe prüfen.

- (8) Alle Reaktionsgefäße anschnippen (oder abzentrifugieren), um die Lösung auf dem Boden der Gefäße aufzufangen.

Amplifikation

Für optischen Fluoreszenznachweis

(Für HumaLoop T)

- (1) Überprüfen, ob die Temperatur des HumaLoop T 67,0 °C beträgt.
- (2) Reaktionsgefäße in den HumaLoop T legen und die grüne Taste drücken, um die LAMP-Reaktion zu starten (40 Minuten bei 67,0 °C). Einzelheiten zur Bedienung des HumaLoop T sind im Benutzerhandbuch des HumaLoop T zu finden.
- (3) Fertigstellung der Polymerase-Inaktivierung bestätigen (wird vom HumaLoop T automatisch abgeschlossen). Alle Reaktionsgefäße aus dem HumaLoop T entnehmen.

(Für anderen Inkubator mit UV-Licht)

- (1) Die Temperatur des Inkubators auf 67,0 °C einstellen (wobei die Temperatur der heißen Haube auf 10 °C über der Reaktionstemperatur oder so nahe wie möglich an diesem Wert eingestellt werden sollte – Temperaturgenauigkeit: $\pm 0,5$ °C).
- (2) Reaktionsgefäße einsetzen und anschließend die Amplifikationsreaktion (40 Minuten bei 67,0 °C) starten.
- (3) Nach 40 Minuten die Polymerase mittels HumaHeat oder Thermoblock (5 Minuten bei 80 °C oder 2 Minuten bei 95 °C) inaktivieren, um die Reaktion zu beenden.

Für die Echtzeit-Trübungsmessung mit HumaTurb C+A (siehe Verfahrensablaufdiagramm)

- (1) Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A für den Nachweis mit diesem Produkt konfigurieren.

- (2) Prüfen, ob die angezeigte Temperatur 67,0 °C erreicht (Turbidimeter sollte vor Gebrauch 20 Minuten vorgeheizt werden).
- (3) Reaktionsgefäße einsetzen und Messung starten.
- (4) Turbidimeter-Anzeige auf einen Trübungsanstieg der Positiv- und Negativkontrollen prüfen. Steigt die Trübung in der Positivkontrolle an, in der Negativkontrolle jedoch nicht, läuft die Amplifikationsreaktion korrekt ab (Abb. 1). Bei anderen Bedingungen verläuft die Amplifikationsreaktion möglicherweise nicht ordnungsgemäß. In einem solchen Fall sind die betroffenen Proben erneut zu testen.
- (5) Fertigstellung der Polymerase-Inaktivierung bestätigen (wird vom Turbidimeter automatisch abgeschlossen). Alle Reaktionsgefäße aus dem Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A entnehmen und ungeöffnet entsorgen.

Amplifikationsplots

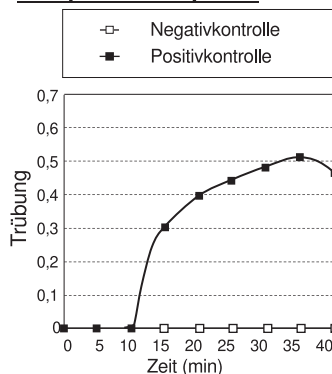


Abb. 1: Amplifikationsplots für Kontrollen

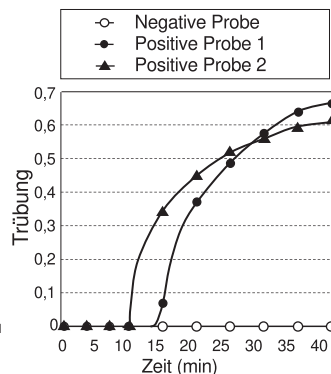


Abb. 2: Amplifikationsplots für Proben

VERFAHRENSHINWEISE

- (1) Die LAMP-Reaktion ist sehr empfindlich, und jede Kontamination mit selbst kleinen Mengen des amplifizierten Produkts könnte zu falsch-positiven Ergebnissen führen.
- (2) Bereiche für Sputumprobenahme und LAMP-Testung trennen.
- (3) Arbeitsplätze vor und nach dem Testen mit > 0,5 % Natriumhypochloritlösung reinigen.
- (4) Alle notwendigen Maßnahmen zur Kontaminationsvermeidung treffen, insbesondere Handschuhwechsel nach Sputumprobenübertragung oder bei Kontakt der Handschuhe mit der DNA-Lösung.
- (5) Beim Umgang mit diesem Produkt mikrobielle Kontamination und Nuklease-Kontamination vermeiden. Selbst eine kleine Menge DNase, die aus Schweiß oder Speichel in das Reaktionsgefäß gelangt, kann die DNA zersetzen und ein falsches Ergebnis verursachen.
- (6) Keine Sputumproben verwenden, die eine große Menge Blut enthalten, da dies die Messungen beeinträchtigen kann. Sollte eine Vorbehandlung der Probe erforderlich sein, bitte im „Manual of Clinical Microbiology“ (12. Auflage)⁶⁾ nachschlagen.
- (7) Die DNA-Lösung sollte idealerweise sofort nach der Herstellung verwendet werden. Wenn dies nicht möglich ist, kann die DNA-Lösung bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 72 Stunden verwendet werden.
- (8) Beim Einfüllen der Lösung in das Reaktionsgefäß den Kontakt zwischen der Injektionskappe des Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit und der Innenwand der Reaktionsgefäße vermeiden. Das Röhrchengestell aufrecht halten und das Röhrchen befüllen, bis der Füllstand der DNA-Lösung zwischen den beiden Linien liegt (30 µL). Inkorrekte Befüllung (über der oberen Linie oder unter der unteren Linie) kann die Leistung beeinflussen.
- (9) **(Für HumaLoop T oder einen anderen Inkubator mit UV-Licht)** Wenn Bläschen vorhanden sind, die Röhrchen anschnippen (oder abzentrifugieren), um die Bläschen zu entfernen.
(Für Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A) Da Bläschen in der Reaktionslösung die Trübungsmessung beeinträchtigen und zu einer Fehlbeurteilung führen können, sollte Bläschenbildung beim Mischen von Reagenz und Probenlösung vermieden werden. Eventuelle Bläschen durch Abzentrifugieren oder Anschnippen entfernen.
- (10) Das dMTB sollte vollständig aufgelöst sein. Nicht diluierte Bestandteile können die Leistung beeinträchtigen, z. B. in Form einer verminderten Sensitivität. Die Röhrchen insbesondere 2 Minuten lang auf dem Kopf stehend lagern.

- (11) Die PC MTB enthält eine hohe Kopienzahl der Kontroll-DNA. Jegliche Kontamination anderer Proben mit der PC MTB vermeiden. Die Proben und die Negativkontrolllösung dispensieren und vor der Dispension der PC MTB alle Reaktionsgefäße verschließen.
- (12) Zum Sammeln der Bestandteile auf dem Boden des Gefäßes das Gefäß mit PC MTB vor dem Öffnen abzentrifugieren oder vorsichtig anschnippen. Gefäß unmittelbar nach Dispension von PC MTB verschließen.
- (13) Bei Verwendung des HumaLoop T oder des Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A wird die Polymerase-Inaktivierung automatisch durchgeführt.
- (14) Bei anderen Inkubatoren ist bei einem optischen Fluoreszenznachweis vor der Beurteilung eine Polymerase-Inaktivierung (5 Minuten bei 80 °C oder 2 Minuten bei 95 °C) durchzuführen, um Fehlbeurteilungen zu vermeiden.
- (15) Bei einem anderen Inkubator darf bei UV-Bestrahlung nicht direkt in das UV-Licht geschaut werden. Bei jedem direkten Blick in das UV-Licht sollte eine Glasscheibe verwendet oder eine Schutzbrille bzw. Augenmaske getragen werden.
- (16) Reaktionsgefäße nach Beginn oder Abschluss der LAMP-Reaktion niemals öffnen. Insbesondere ist darauf zu achten, dass die Reaktionsgefäße beim Entladen aus dem Inkubator nicht versehentlich aufgehen.
- (17) Amplifikate in den Röhrchen nicht zur Elektrophorese oder für andere Anwendungen wiederverwenden.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Für optischen Fluoreszenznachweis

(Für HumaLoop T)

Jedes Reaktionsgefäß in die Fluoreszenz-Detektionseinheit stellen, bestrahlen und von der Seite beobachten.

(Für Inkubator mit UV-Licht)

Den Boden jedes Reaktionsgefäßes bestrahlen und von der Seite durch eine Schutzbrille oder eine UV-blockierende Augenmaske beobachten.

Für eine gültige Testserie müssen folgende Ergebnisse erzielt werden:

- Positivkontrolle: Emission von grünem Fluoreszenzlicht
- Negativkontrolle: keine Emission von Fluoreszenzlicht

Falls eine der Kontrollen ungültig ist, sollten alle Proben der Testserie als ungültig gemeldet und der Test wiederholt werden.

Nach erfolgter Bestätigung der Gültigkeit der Testserie sind die Proben wie folgt zu beurteilen:

- Positive Probe: Emission von grünem Fluoreszenzlicht.
- Negative Probe: keine Emission von Fluoreszenzlicht.

Für die Echtzeit-Trübungsmessung mit HumaTurb C+A

Nachdem bestätigt wurde, dass die Trübung in der Positivkontrolle zunimmt, in der Negativkontrolle jedoch nicht, sind die Proben nach den folgenden Kriterien (Abb. 1 und 2) zu bewerten.

- Positiv: leichter Trübungsanstieg zu beobachten
- Negativ: kein Trübungsanstieg zu beobachten

Anmerkungen:

- (1) Die Nachweisgrenze für dieses Produkt sind 0,38 Genomäquivalente pro Test. Auch bei einem negativen Test sollten sich Patienten mit einem anhaltenden, auf eine MTBC-Infektion hindeutenden Symptom erneut ärztlich untersuchen lassen.
- (2) Obwohl Primer auf eine bestimmte Genregion mit einer relativ geringen Anzahl von Variationen ausgerichtet sind, kann MTBC möglicherweise weitere Variationen in dieser Region annehmen und die Sensitivität dieses Produkts verringern. Deshalb kann eine MTBC-Infektion trotz negativen Tests nicht immer ausgeschlossen werden.
- (3) Die Testergebnisse können durch Probenahme und -transport, Probenvorbereitung, Inhibitoren und andere Verfahrensfehler im Labor beeinträchtigt werden. Ein negativer Test schließt das Vorhandensein von MTBC in der Probe nicht aus. Für eine klinische Diagnose sind das Krankheitsbild des Patienten und alle weiteren vorliegenden Laborergebnisse zu berücksichtigen.
- (4) Dieses Produkt ist ein Kit für den qualitativen Nachweis. Es ist nicht für die quantitative Messung konzipiert. Die Intensität des beobachteten Fluoreszenzlichts oder die Anstiegszeit der vom Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A gemessenen Trübung korreliert nicht mit der Menge an Template-DNA.

STÖRSUBSTANZEN

Interne Studien zeigten keine Beeinflussung der Messung durch das Vorhandensein von freiem Bilirubin (91,0 mg/dL), konjugiertem Bilirubin (101,0 mg/dL), Chylus (Formazin-Trübung: 7.300) und hämolisiertem Hämoglobin (2.475 mg/dL). Hinsichtlich Arzneimitteln ergaben interne Studien keine Beeinflussung der Messung durch das Vorhandensein von Isoniazid (100 µg/mL), Ethambutol (20 µg/mL), Rifampicin (100 µg/mL), Pyrazinamid (500 µg/mL), Kanamycin (20 µg/mL) und Streptomycin (500 µg/mL).

LEISTUNGSDATEN

1. Genauigkeit

Beim Testen der folgenden Proben:

- Negative Probe (Konzentration: 0 Genomäquivalente/Test)
- Positive Probe 1 (1,875 Genomäquivalente/Test)
- Positive Probe 2 (125 Genomäquivalente/Test)

Die negative Probe sollte negativ getestet und die positiven Proben 1 und 2 positiv getestet werden.

2. Reproduzierbarkeit innerhalb einer Testserie

Beim Testen von fünf negativen und positiven Proben gleichzeitig sollte die negative Probe durchgehend negativ getestet und die positive Probe durchgehend positiv getestet werden.

3. Nachweisgrenze

0,38 Genomäquivalente/Test

4. Kreuzreaktivität

In Bezug auf nichttuberkulöse Mykobakterien (*Mycobacterium asiaticum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium gastri*, *Mycobacterium haemophilum*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium flavescens*) ($1,0 \times 10^4$ Genomäquivalente pro Test) und Bakterien für Atemwegserkrankungen (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma pneumoniae*(I), *Mycoplasma pneumoniae*(II)) ($1,0 \times 10^5$ Genomäquivalente pro Test) testete das Messsystem negativ auf alle Bakterienarten. Es trat keine Kreuzreaktion auf.

5. Reaktivität gegen MTBC

Reaktivität gegen *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* und *Mycobacterium africanum* wurde bestätigt.

6. Information über Kalibrator

Beim Leistungstest für dieses Produkt wurde die Plasmid-DNA verwendet, die das *gyrB* und die IS-Region der Genom-DNA von *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank Nr. NC_000962) als Kalibrator verwendet.

7. Klinische Leistung

Bis heute ist die Tuberkulose eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten der Welt. Weltweit wird die Gesamtzahl der neuen Tuberkulosefälle auf etwa 10 Millionen geschätzt, und die Zahl der Sputumabstrich-positiven Fälle liegt bei etwa 4,3 Millionen.⁷⁾ In Japan wurden im Jahr 2008 24.760 Patienten neu als an Tuberkulose erkrankt registriert, von denen 2216 starben.⁸⁾

Dieses Produkt wurde in zwei medizinischen Einrichtungen, die für Infektionskrankheiten der Klasse 2 ausgewiesen sind (ausgewiesene medizinische Einrichtungen, die über Betten ausschließlich für Patienten mit Tuberkulose verfügen), auf seine Leistungsfähigkeit bei der Diagnose von Patienten mit Verdacht auf Tuberkulose untersucht. Zusammen mit PCR und TRC, die beide bereits in Japan zugelassen waren, wurde dieses Kit verwendet, um zwei Tage lang gesammelte Sputumproben zu testen (320 Proben von 160 Probanden), und die Ergebnisse wurden zwischen den Kits verglichen. Die auf diesem Produkt basierenden Tests umfassten insbesondere Bewertungen für die DNA-Extraktlösung, die aus dem unbehandelten Sputum gewonnen wurde (im Folgenden LAMP für unbehandeltes Sputum), und solche für die DNA-Extraktlösung, die aus dem mit NALC-NaOH und einigen anderen Verfahren vorbehandelten Sputum gewonnen wurde (im Folgenden LAMP für vorbehandeltes Sputum).

Wie aus den folgenden Tabellen hervorgeht, war die Gesamtübereinstimmungsrate wie folgt günstig: LAMP für unbehandeltes Sputum vs. PCR: 91,5 % (291/318 Probanden); LAMP für vorbehandeltes Sputum vs. PCR: 92,1 % (293/318); LAMP für unbehandeltes Sputum vs. TRC: 94,3 % (230/244); LAMP für vorbehandeltes Sputum vs. TRC: 93,0 % (227/244). Außerdem stimmten die Auswertungen der Echtzeit-Trübungsmessung und des optischen Fluoreszenznachweises vollständig überein, mit Ausnahme einer Probe (diese Probe war blutiges Sputum und wurde beim optischen Fluoreszenznachweis aufgrund der Störung durch Blut falsch negativ getestet). Daher betrachten wir die beiden Arten von Bewertungen als identisch miteinander. Die folgenden Tabellen zeigen die Testergebnisse, die mit der Echtzeit-Trübungsmessung erzielt wurden. Bemerkenswert ist, dass die Ergebnisse des optischen Fluoreszenznachweises mit dem HumaLoop T dieselben waren wie mit dem Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A.

LAMP		PCR	
		Positiv	Negativ
Unbehandeltes Sputum	Positiv	196	7
	Negativ	20	95
Gesamtübereinstimmungsrate		91,5 % (291/318)	
Diagnostische Empfindlichkeit		90,7 % (196/216)	
Diagnostische Spezifität		93,1 % (95/102)	
Positiver prädiktiver Wert		96,6 % (196/203)	
Negativer prädiktiver Wert		82,6 % (95/115)	
Wahrscheinlichkeitsverhältnis + (Sensitivität/(1-Spezifität))		13,1	
Wahrscheinlichkeitsverhältnis - ((1-Sensitivität)/Spezifität)		0,0999	

LAMP		TRC	
		Positiv	Negativ
Unbehandeltes Sputum	Positiv	163	5
	Negativ	9	67
Gesamtübereinstimmungsrate		94,3 % (230/244)	
Diagnostische Empfindlichkeit		94,8 % (163/172)	
Diagnostische Spezifität		93,1 % (67/72)	
Positiver prädiktiver Wert		97,0 % (163/168)	
Negativer prädiktiver Wert		88,2 % (67/76)	
Wahrscheinlichkeitsverhältnis + (Sensitivität/(1-Spezifität))		13,9	
Wahrscheinlichkeitsverhältnis - ((1-Sensitivität)/Spezifität)		0,0451	

LAMP		TRC	
		Positiv	Negativ
Vorbehandeltes Sputum	Positiv	157	2
	Negativ	15	70
Gesamtübereinstimmungsrate		93,0 % (227/244)	
Diagnostische Empfindlichkeit		91,3 % (157/172)	
Diagnostische Spezifität		97,2 % (70/72)	
Positiver prädiktiver Wert		98,7 % (157/159)	
Negativer prädiktiver Wert		82,4 % (70/85)	
Wahrscheinlichkeitsverhältnis + (Sensitivität/(1-Spezifität))		32,6	
Wahrscheinlichkeitsverhältnis - ((1-Sensitivität)/Spezifität)		0,0895	

BESTELLINFORMATIONEN

Produkt Nr.	Produktbezeichnung	Wirksame Bestandteile
972000	Loopamp™ MTBC Detection Kit	96 Tests
980000	HuMax ITA	Mikrozentrifuge
970000	Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit	90 Tests
964000	HumaHeat Incubator	Thermoblock
971000	Pipette-60 Set	1 Pipette; 4 x 96 Spitzen
961000	HumaLoop T	1 Haupteinheit 1 Fluoreszenz-Detektionseinheit
963200	HumaTurb C+A	1 Kontrollgerät 1 Amplifikationsgerät

HINWEIS

Bitte melden Sie jegliche schwerwiegenden Zwischenfälle, die im Zusammenhang mit dem Gerät auftreten, dem Hersteller oder der zuständigen Behörde des Mitgliedsstaates, in dem sich der Benutzer und/oder der Patient aufhält.

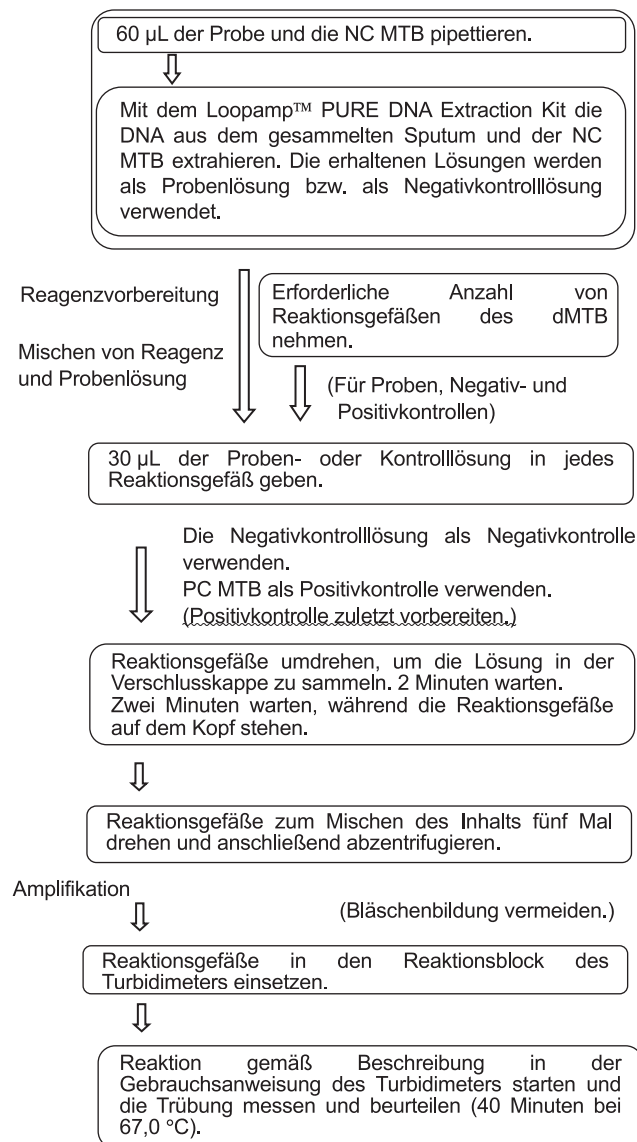
LITERATUR

- 1) Notomi T., et al.: Nucleic Acids Research 28, No. 12, e63 (2000)
- 2) Nagamine K., et al.: Clin. Chem. 47, No. 9, 1742–1743 (2001)
- 3) Mori Y., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 289, No. 1, 150–154 (2001)
- 4) Tomita N., et al.: Nat. Protoc. 3, No. 5, 877–882 (2008)
- 5) The guideline for the bio-safety and bio-hazard (by the Japanese Society for Bacteriology): Japanese Journal of Bacteriology 54, No. 3, 667–715 (1999)
- 6) Isabella MGaby EP and Nicole P., et al.: Manual of Clinical Microbiology, 12th edition, ASM PRESS, 558–575 (2019)
- 7) WHO global TB database:
<https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/data>
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf>
- 8) Kekkaku No Tokei 2009 (Statistics of TB 2009): Japan Anti-Tuberculosis Association

Ablaufdiagramm

Vorgehensweise für Echtzeit-Trübungsmessung

Zubereitung der Probenlösung und der Negativkontrolllösung



Abschluss der Polymerase-Inaktivierung (5 Minuten bei 80 °C oder 2 Minuten bei 95 °C) bestätigen. Alle Reaktionsgefäße aus dem Turbidimeter entnehmen und ungeöffnet entsorgen. Dabei darauf achten, die Gefäße nicht zu beschädigen.

TABELLE DER SYMBOLE

REF Katalognummer	In Gebrauchsanweisung nachschlagen	Verfallsdatum
IVD Medizinprodukt für In vitro-Diagnostik	Hersteller	Temperaturbegrenzung
LOT Chargennummer	Inhalt ausreichend für <n> Tests	Bevollmächtigter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft

IVD **0123**

Importeur

EC **REP**

HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH

Max-Planck-Ring 21, 65205 Wiesbaden, Germany



EIKEN CHEMICAL CO., LTD.

*4-6 Kanda Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo,
101-0062 JAPAN

*Datum der Revision: 2026-08-01