

***Chlamydia trachomatis* PCR kit**

**Real-Time PCR Testkit zur Detektion von
Chlamydia trachomatis DNA**

(Gebrauchsanweisung: Seite 4)

**Real Time PCR test for detection of
Chlamydia trachomatis DNA**

(Instructions for use: page 19)

IVD

Chlamydia trachomatis
PCR kit



112 Untersuchungen
112 tests

Form S 84-09
Form T 84-10

REF

Chlamydia trachomatis
PCR kit



56 Untersuchungen
56 tests

Form S 84-09-56
Form T 84-10-56

REF

Chlamydia trachomatis
PCR kit



24 Untersuchungen
24 tests

Form S 84-09-24
Form T 84-10-24

REF

KENNZEICHEN/ SYMBOLS LEGEND

	In Vitro Diagnostika In Vitro Diagnostic Medical Device		EU-Konformitätserklärung EC Declaration of conformity
	Bestellnummer Catalogue number		Lotnummer Batch code
	Haltbarkeit Use by		Hersteller Manufacturer
	Herstellungsdatum Date of manufacture		Temperaturbegrenzung Temperature limitation
	Lichtgeschützt Protect from light		Trocken halten Keep dry
	Ausreichend für < 112/56/24 > Prüfungen Contains sufficient for < 112/56/24 > tests		Vorsicht, weitere Dokumente notwendig Caution, consult accompanying documents
	Gebrauchsanweisung betrachten Consult operating instructions		PCR-Mix <i>C. trachomatis</i> , Form T
	Negativkontrolle Negative Control		PCR-Mix <i>C. trachomatis</i> , Form S
	Taq DNA-polymerase		Interne Kontrolle Internal Control
	Positivkontrolle Positive Control		

1. VERWENDUNGSZWECK

Der ***Chlamydia trachomatis* PCR Testkit** ist für eine schnelle und qualitative Detektion von ***Chlamydia trachomatis* DNA** in Proben, extrahiert aus Abstrichen der urethralen, endozervikalen und vaginalen Schleimhaut sowie Urinproben, mittels Real-Time PCR bestimmt, zur Detektion einer *C. trachomatis* Infektion.

2. TESTPRINZIP

Die Durchführung des ***Chlamydia trachomatis* PCR Testkit** umfasst drei Schritte: DNA Extraktion, PCR Amplifikation und Datenanalyse.

Zunächst wird die DNA Extraktion der Probe unter Zugabe der Internen Kontrolle **IC** durchgeführt. **IC** ist im ***Chlamydia trachomati* PCR Testkit** enthalten und wird jeder Probe - zur Kontrolle der DNA Extraktion und PCR Amplifizierungsschritte - zugegeben.

Das ***Chlamydia trachomati* PCR Testkit** wird im zweiten Schritt verwendet um *C. trachomatis* DNA zu detektieren. Während der Real-Time PCR werden sowohl Fragmente der DNA von *C. trachomatis* als auch der **IC** DNA amplifiziert und gleichzeitig detektiert. Die Amplifikation führt zu einem quantitativen Anstieg der Amplifikate von *C. trachomatis* DNA und der **IC** DNA, welche darauffolgend mit den Fluoreszenzsonden hybridisieren.

Durch die Exonuklease-Aktivität der Taq DNA Polymerase **Taq** werden die Oligonukleotidsonden degradiert und die Fluorophorgruppe vom Quencher getrennt. Der Effekt des Quenchers erlischt und die entstehende Fluoreszenzemission kann mittels Real-Time PCR Thermocycler detektiert und gemessen werden.

Die Präsenz der Ziel-DNA in der Probe wird mit den resultierenden Quantifizierungszyklen (=Cq) („Threshold Cycle“ (Ct) oder Kreuzungspunkten (Cp)) belegt.

Die eingesetzte “hot start” Taq DNA Polymerase **Taq** erhöht zudem die Sensitivität und Spezifität des Testkits.

3. PACKUNGSGEHALT

3.1 Format S (Flüssige Reaktionsmische aliquotiert in low profile 0.2 ml 8-Well-Streifen, DNA Polymerase separat)

Label	Komponenten	84-09		84-09-56		84-09-24	
		Volumen, μ L	Anzahl	Volumen, μ L	Anzahl	Volumen, μ L	Anzahl
Ct-Mix-S	PCR-Mix <i>C. trachomatis</i> , Form S	10	14×8×0.2 mL Röhrrchen	10	7×8×0,2 mL Röhrrchen	10	3×8×0,2 mL Röhrrchen
Taq	Taq DNA-polymerase	1120	1 Röhrrchen	560	1 Röhrrchen	240	1 Röhrrchen
PC	Positiv Kontrolle	250	1 Röhrrchen	250	1 Röhrrchen	250	1 Röhrrchen
IC	Interne Kontrolle	1120	2 Röhrrchen	1120	1 Röhrrchen	1120	1 Röhrrchen
NC	Negativ Kontrolle	1500	1 Röhrrchen	1500	1 Röhrrchen	1500	1 Röhrrchen

Dieses Format wurde zur Verwendung mit folgenden Real-Time PCR Thermocyclern validiert: CFX96, Light Cycler 96 (LC 96) und DTprime (entsprechend auch die Thermocycler DTLite, SaCycler, AstraCycler 48 und AstraCycler 96). Wenn andere Real-Time PCR Thermocycler verwendet werden sollen, die mit low profile Mikrozentrifugenröhrrchen für PCR kompatibel sind, kontaktieren Sie zuvor den Hersteller dieses Kits für weitere Informationen.

3.2 Format T (Flüssige Reaktionsmische aliquotiert in 0.2 ml Mikrozentrifugenröhrchen, DNA Polymerase separat)

Label	Komponenten	84-10		84-10-56		84-10-24	
		Volumen, μL	Anzahl	Volumen, μL	Anzahl	Volumen, μL	Anzahl
Ct-Mix-T	PCR-Mix <i>C. trachomatis</i> , Form S	10	112×0.2 mL Röhrchen	10	56×0.2 mL Röhrchen	10	24×0.2 mL Röhrchen
Taq	Taq DNA-polymerase	1120	1 Röhrchen	560	1 Röhrchen	240	1 Röhrchen
PC	Positiv Kontrolle	250	1 Röhrchen	250	1 Röhrchen	250	1 Röhrchen
IC	Interne Kontrolle	1120	2 Röhrchen	1120	1 Röhrchen	1120	1 Röhrchen
NC	Negativ Kontrolle	1500	1 Röhrchen	1500	1 Röhrchen	1500	1 Röhrchen

Dieses Format wurde zur Verwendung mit folgendem Real-Time PCR Thermocycler validiert: Rotor-Gene Q (entsprechend auch der Thermocycler Rotor-Gene 3000/6000). Wenn andere Real-Time PCR Thermocycler verwendet werden sollen, die mit Standard Mikrozentrifugenröhrchen für PCR kompatibel sind, kontaktieren Sie zuvor den Hersteller dieses Kits für weitere Informationen.

4. ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN UND EQUIPMENT

- Biosicherheitskammer;
- Real-Time PCR Thermocycler: CFX-96, DTprime (oder entsprechend auch die Thermocyclern DTlite, SaCycler, AstraCycler 48 und AstraCycler 96); Light Cycler 96, Rotor-Gene Q (oder entsprechend auch der Thermocycler Rotor-Gene 3000/6000)
- Vortexer;
- Mikrozentrifuge (passend für 0,2 ml Röhrchen, max. 2400 rpm);
- 2 separate Pipettensätze für DNA-freie und DNA-haltige Komponenten;
- Filterspitzen (10, 100, 200, 1000 μL);
- Einweg 1,5 ml-„Safe-seal“-Mikrozentrifugenröhrchen;

- Separate Arbeitsbereiche zur DNA Extraktion, (Probenvorbereitungs-Bereich) Vorbereitung der PCR-Reagenzien (PCR-vorbereitungs-Bereich) und PCR-Amplifikation (Amplifikations-Bereich) mit je eigenem Pipettensatz, Equipment und Laborkleidung.
- Multi DNA Extraction kit (Ref 80-01) oder Rapid DNA Extraction kit (REF 80-02)

5. LAGERUNG UND STABILITÄT DES TESTKITS

Der jeweilige Testkit ist für 112 (Ref. 84-09/10), 56 (Ref. 84-09-56/10-56) oder 24 (Ref. 84-09-24/10-24) Reaktionen inklusive der Kontrollen bestimmt.

Der ***Chlamydia trachomatis* PCR Testkit** sollte bei -18...-30 °C, vorzugsweise in der Originalverpackung bis zum Verfallsdatum gelagert werden. Der Hersteller garantiert die Funktionalität der Kitkomponenten bis zu einer Anzahl von 15 Einfrier- und Auftauzyklen.

Das Verfallsdatum des Kits ist auf der Packung und das Verfallsdatum für jede Komponente auf dem jeweiligen Etikett angegeben. Eine Lagerung bei +25 °C ist für maximal 7 Tage zulässig (alle Formate).

6. PROBENNAHME, LAGERUNG UND TRANSPORT

Gesamt DNA kann aus Abstrichen der urethralen, endozervikalen und vaginalen Schleimhaut sowie Urinproben extrahiert werden.

Art des Probenmaterials	Probennahme*	Lagerung-Transport**
Abstrich der urethralen, endozervikalen und vaginalen Schleimhaut	Proben gesammelt und transprotiert in 0,5 ml einer 0,9% NaCl-Lösung oder einem anderen für diesen Zweck zugelassenen Transportmedium.	• Bei +18...+25 °C für ≤ 48 h • gekühlt bei 2-8°C für ≤ 4 Tage • gefrohren bei -18...-35 °C > 4 Tage
Urine	Die ersten 10 ml bis 50 ml Urin werden im Idealfall zwischen 2 h und 6 h nach der letzten Miktio in einem sterilen Schraubverschlussbehälter ohne Konservierungsmittel gesammelt	• Bei +18...+25 °C für ≤ 48 h • gekühlt bei 2-8°C für ≤ 2 Wochen • gefrohren bei -18...-35 °C > 2 Wochen

*Um Probenmaterial zu sammeln, sind die Standardverfahren der Probenentnahme geeignet.

**Stellen Sie sicher, dass der Transport von Probenmaterial menschlichen Ursprungs, allen lokalen und nationalen Vorschriften für den Transport von ätiologischem Probenmaterial entspricht.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Positiv- und Negativkontrollen müssen bei jedem Lauf mitgeführt werden.

Der komplette Ablauf besteht aus drei Schritten:

- I. DNA Extraktion
- II. Real-Time PCR
- III. Datenanalyse und Interpretation

I. DNA Extraktion

ANMERKUNG: Die Qualität der extrahierten DNA hat einen wesentlichen Einfluss auf die Performance/Leistung des gesamten Testsystems. Es muss daher sichergestellt werden, dass das System / die Methode, welche zur Extraktion der DNA verwendet wird, mit der Real-Time PCR-Technologie kompatibel ist. Das *Chlamydia trachomatis* PCR kit wurde mit den folgenden DNA Extraktionskits validiert, deren Verwendung deswegen ausdrücklich durch den Hersteller empfohlen wird:

- Multi DNA Extraction kit (REF 80-01)
- Rapid DNA Extraction kit (REF 80-02)

Die Kompatibilität anderer DNA-Extraktionsverfahren zur Verwendung mit dem *Chlamydia trachomatis* PCR kit muss vom Anwender validiert werden.

- 1) **IC** herausnehmen und restliche Komponenten zurück in den Tiefkühlschrank stellen. **IC** vorsichtig vortexen und vor dem Gebrauch für 2-3 s zentrifugieren.
- 2) 1,5 ml Reaktionsgefäße entsprechend der Probenanzahl bereitstellen + 1 Röhrchen für die Negative Extraktionskontrolle vorbereiten und mit „NEC“ markieren.

ANMERKUNG: Sollten Sie das Rapid DNA Extraction kit (REF 80-02) verwenden, nehmen Sie zur Vorbereitung die notwendige Menge von 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen mit Lysepuffer aus dem DNA Extraktionskit und markieren diese.

ANMERKUNG: Jede Extraktion erfordert das Mitführen der „NEC“.

3) Bei Verwendung des Astra Biotech DNA Extraktionskits Schritte 4) bis 6) ignorieren und der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits folgen, sonst mit 4) fortsetzen.

4) **20 µl IC** in **jedes** 1,5 ml **Reaktionsgefäß** pipettieren.

5) **100 µl NC** in das mit **“NEC”** markierte **Reaktionsgefäß** geben.

ANMERKUNG: Anstelle der **NC** kann Elutionspuffer, der im DNA Extraktionskit enthalten ist, verwendet werden.

6) Der Gebrauchsanweisung des jeweiligen Extraktionskits folgen.

II. Real-Time PCR

Vorbereitung der Kitkomponenten:

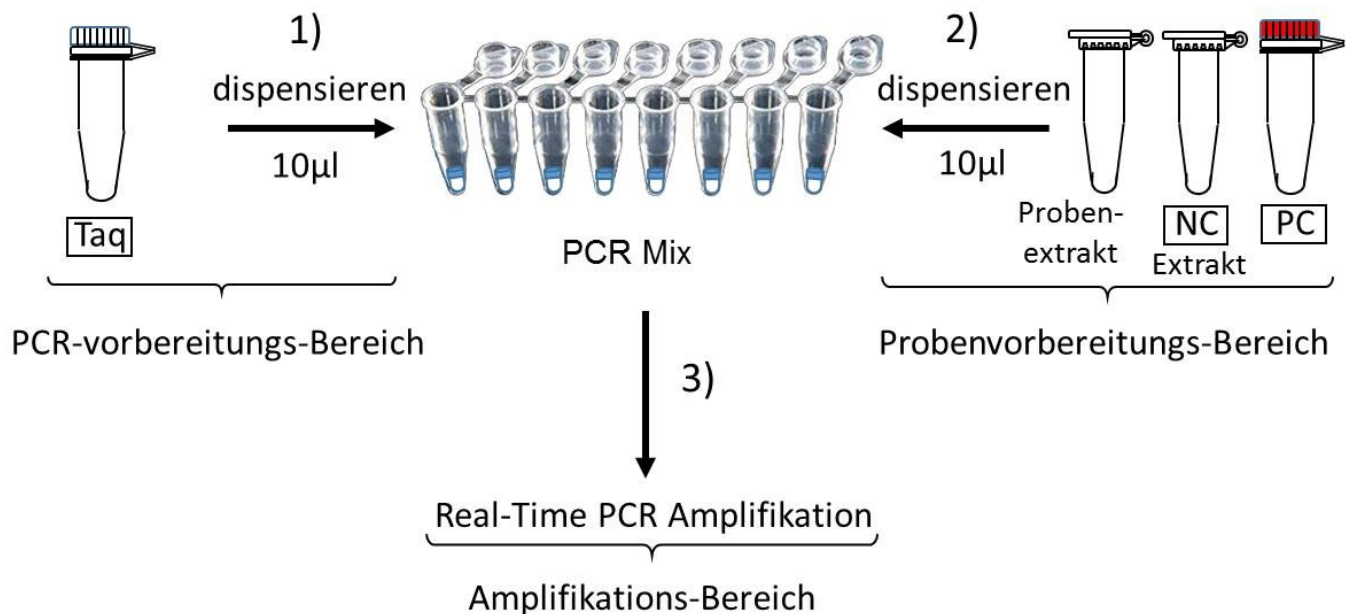
1) Nehmen Sie folgende Komponenten des Kits aus dem Gefrierschrank und tauen diese auf:

- **PC** (Positivkontrolle)
- **Taq** (Taq-Polymerase)
- die benötigte Menge von 0,2 mL Mikrozentrifugenröhrchen / Kavitäten mit **Ct-Mix-S/T** entsprechend der Anzahl von Proben + 1 Mikrozentrifugenröhrchen / Kavitäten für „PC“ (Positivkontrolle) + 1 Mikrozentrifugenröhrchen / Kavitäten für „NEC“ (Negativkontrolle).

Stellen Sie die restlichen Komponenten zurück in den Gefrierschrank

2) Platzieren Sie **PC** im Probenvorbereitungs-Bereich, welcher für die DNA-Extraktion und das Pipettieren von DNA vorgesehen ist.

Prozessablauf



1) Vorbereitung des PCR-Mixes

ANMERKUNG: Die Vorbereitung des PCR-Mixes muss im PCR-vorbereitungs-Bereich durchgeführt werden. Führen Sie die Vorbereitung des PCR-Mixes nicht im gleichen Bereich durch wie die DNA-Extraktion oder Amplifikation um eine Kontamination mit DNA zu vermeiden.

1. Markieren Sie die vorbereiteten PCR-Mikrozentrifugenröhrchen mit **Ct-Mix-S/T**

ANMERKUNG: Unterschiedliche Positionen für die Beschriftung der Röhrchen sind aufgrund unterschiedlicher Arten der Fluoreszenzdetektion nötig: Bei Verwendung der Real-Time PCR Thermocycler CFX96, CFX96 Touch, LC 96 oder SaCycler (DTprime) sind die Röhrchen außerhalb der Deckelmitte oder am Röhrchenrand zu markieren. Bei Verwendung der Real-Time PCR Thermocycler Rotor-Gene Q sind die Röhrchen auf dem Deckel zu markieren.

2. Vortexen Sie vorsichtig die **Taq** und zentrifugieren diese anschließend bei 1500-2400 rpm für 2-3 Sekunden.

3. 10 µl Taq in jedes 0,2 ml **Röhrchen/ Kavität** pipettieren dabei Paraffin-Kontakt vermeiden.

2) Pipettieren der Proben und Kontrollen

ANMERKUNG: Das Pipettieren der Proben-DNA und Kontrollen müssen im Probenvorbereitungs-Bereich durchgeführt werden.

ANMERKUNG: Nutzen Sie eine eigene Filter-Pipettenspitze für jede DNA-Probe.

1. zentrifugieren Sie die aus der jeweiligen Probe extrahierte DNA und „NEC“ (**NC**) bei 13000 rpm für 1 min kurz bevor Sie diese in die PCR-Mikrozentrifugenröhrchen hinzugeben.
2. **10 µl DNA** (extrahiert aus der Probe und „NEC“) in separate PCR-Mikrozentrifugenröhrchen geben (Paraffin-Kontakt vermeiden).
3. Vortexen und zentrifugieren Sie die **PC** bei 1500-2400 rpm für 2-3 Sekunden.
4. Fügen Sie **10 µl PC** dem mit „PC“ markierte Röhrchen/ Kavität hinzu.
5. Verschließen Sie die Mikrozentrifugenröhrchen und zentrifugieren diese bei 1500-2400 rpm für 2-3 Sekunden.

3) Real-Time PCR:

ANMERKUNG: Die Real-Time PCR-Amplifikation muss im Amplifikations-Bereich durchgeführt werden. Es wird empfohlen für diesen Bereich separate Räumlichkeiten zu verwenden.

- Röhrchen/ Platte in den Real-Time PCR Thermocycler stellen.
- Platteninformation eingeben. Einrichten der Fluoreszenzdetektion mit den Kanälen ROX / Orange und FAM / Grün.

- PCR Protokoll für alle PCR Thermocycler starten:

Schritt	Temperatur, °C	Daten Erhebung	Zeit	Nummer der Zyklen
Halten	94	-	3 min	1
PCR	94	-	10 s	5
	60		20 s	
PCR	94	-	10 s	45
	60	ROX/ Orange FAM/ Green	20 s	

- Befolgen Sie auch die Anweisungen des jeweiligen Herstellers, bevor Sie den Real-Time PCR Thermocycler verwenden.

III. Datenanalyse

1) Allgemeines:

Der ROX-Farbstoff wird für die Detektion der *C. trachomatis* DNA und FAM für die Detektion der **IC** DNA genutzt.

Die Analyse kann mit der PCR Thermocycler internen Software gemäß deren Gebrauchsanleitung durchgeführt werden. Eine detaillierte Beschreibung zu den PCR Protokollen und Datenanalysen ist für bereits validierte PCR Thermocycler auch in der Anleitung «Astra Biotech: Real-Time PCR kits Guidelines» zu finden.

Eine Analysis kann nur mit folgenden Parametern durchgeführt werden: Cq **Ct**, Cq **PC** und Cq **IC**, spezifiziert für jedes Lot im Qualitätskontrolldatenblatt, das mit dem jeweiligen Kit mitgeliefert wird.

Cq **Ct** = kritischer Wert des Quantifizierungszyklus für *C. trachomatis* im ROX Kanal, essentiell für Detektion positiver Ergebnisse

Cq_{PC} = kritischer Wert des Quantifizierungszyklus der Positivkontrolle im ROX Kanal zur Bewertung der Kitkomponenten (zur generellen Kontrolle der Reagenzien-Effektivität) essentiell für Detektion negativer Ergebnisse

Cq_{IC} = kritischer Wert des Quantifizierungszyklus der Internen Kontrolle im FAM Kanal zur Bewertung aller PCR Schritte (Gesamteffektivität) in jedem Röhrchen inkl. Inhibition und DNA Verlust

Die Testergebnisse des Laufes sind gültig wenn:

- $Cq_{PC} \leq Cq_{PC}$ im ROX Kanal. Wenn jedoch $Cq_{PC} > Cq_{PC}$ können alle im Lauf positiv gewerteten Proben als gültig betrachtet werden, alle negativ gewerteten Proben hingegen als ungültig.
- $Cq_{NEC} > Cq_{Ct}$ im ROX Kanal und $Cq_{NEC} \leq Cq_{IC}$ im FAM Kanal (Ausnahmen bei Kontamination beachten, siehe 2))

2) Interpretation der Daten:

Proben gelten als positiv für *C. trachomatis* DNA wenn:

$Cq \leq Cq_{Ct}$ im ROX Kanal,

selbst wenn $Cq > Cq_{IC}$ im FAM Kanal oder nicht bestimmt

Proben gelten als negativ für *C. trachomatis* DNA wenn:

$Cq > Cq_{Ct}$ im ROX Kanal oder nicht bestimmt

$Cq \leq Cq_{IC}$ im FAM Kanal,

Für PC: $Cq \leq Cq_{PC}$ im ROX Kanal

Proben gelten als ungültig wenn:

$Cq > Cq_{Ct}$ im ROX Kanal und entweder:

- $Cq > Cq_{IC}$ im FAM Kanal oder nicht bestimmt
- Für PC in the ROX channel $Cq > Cq_{PC}$ oder nicht bestimmt

Eine Kontamination ist präsent wenn:

$Cq_{NEC} < Cq_{Ct}$ im ROX Kanal. In diesem Fall sollten alle Maßnahmen getroffen werden, um die Ursache der Kontamination zu eliminieren. Beim Vorliegen einer Kontamination sind alle Proben, die als positiv in diesem Lauf detektiert wurden, ungültig, wenn $Cq \geq (Cq_{NEC} - 5)$ im ROX Kanal. Diese Proben sind ab dem Schritt der DNA Extraktion erneut zu messen. Alle anderen Resultate gelten als gültig.

Interpretation der Daten, Zusammenfassung

Cq ROX Detektion der <i>C.t.</i> DNA in einer Probe	Cq FAM Detektion der IC DNA in einer Probe	Cq ROX Detektion der <i>C.t.</i> DNA in Positiv- kontrolle	Cq ROX Detektion der <i>C.t.</i> DNA in Negativ- kontrolle	Ergebnis
$Cq \leq Cq_{Ct}$	alle	alle	$Cq > Cq_{Ct}$ oder N/A	Positiv
$Cq > Cq_{Ct}$ oder N/A	$Cq \leq Cq_{IC}$	$Cq \leq Cq_{PC}$	alle	Negativ
$Cq > Cq_{Ct}$ oder N/A	$Cq > Cq_{IC}$ oder N/A	alle	alle	Ungültig
$Cq > Cq_{Ct}$ oder N/A	alle	$Cq > Cq_{PC}$ oder N/A	alle	
$Cq \leq Cq_{Ct}$ und $Cq > Cq_{NEC} - 5$	alle	alle	$Cq \leq Cq_{Ct}$	
$Cq \leq Cq_{Ct}$ und $Cq \leq Cq_{NEC} - 5$	alle	alle	$Cq \leq Cq_{Ct}$	Positiv

Abkürzungen:

Cq **Ct** = kritischer Wert des Quantifizierungszyklus für *C. trachomatis*

Cq **IC** = kritischer Wert des Quantifizierungszyklus der Internen Kontrolle

Cq **PC** = kritischer Wert des Quantifizierungszyklus der Positivkontrolle

Cq **PC**, Cq **IC**, Cq **Ct** sind für jedes Lot im jeweils mitgelieferten Qualitätskontrolldatenblatt angegeben.

NEC = negative Extraktionskontrolle

Cq von NEC = kritischer Wert des Quantifizierungszyklus der Negativkontrolle im ROX Kanal

N/A = Cq Wert wurde nicht bestimmt

8. TESTCHARAKTERISTIKA

Analytische Sensitivität:

Das Detektionslimit des Testkits wurde via Probitanalyse ermittelt und beträgt 600 Kopien der genomischen DNA von *C. trachomatis* pro 1 ml (10 Kopien genomischer DNA pro Reaktion). Dieses Limit ist für das Konfidenzniveau von 95% definiert, unter Annahme, dass 100 µl Probe zur DNA Extraktion verwendet werden und das Elutionsvolumen 60 µl entspricht.

Analytische Spezifität:

Falsch-positive Ergebnisse mit humaner DNA Proben und Standard DNA und Standard DNA Proben von *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus* spp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydomphila pneumoniae*,

Chlamydophila psittaci, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria flava*, *Neisseria subflava*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria sicca*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, *Candida albicans*, HSV type 1 und 2, CMV und HPV konnten nicht nachgewiesen werden.

9. GRENZEN DER METHODE

Jede klinische Diagnose sollte auf den Resultaten mehrerer in-vitro-diagnostischer Methoden beruhen. Zur Erstellung einer Diagnose sollte der Arzt alle verfügbaren klinischen und Laborbefunde berücksichtigen.

10. VORSICHTSMAßNAHMEN

- **Der Testkit ist ausschließlich zum in vitro–Gebrauch bestimmt.** Um zuverlässige Testergebnisse zu erhalten, ist die Arbeitsanleitung strikt einzuhalten. Diese Gebrauchsanweisung ist nur für das vorliegende Testkit mit dem aufgeführten Inhalt gültig. Jeglicher Austausch der Kitkomponenten ist durch die CE-Regularien nicht gestattet.
- Der Testkit ist nur durch geschultes Personal entsprechend der GLP Richtlinien (Gute Laborpraxis) durchzuführen.
- Der Testkit darf nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Das Mischen von Reagenzien verschiedener Chargen oder aus verschiedenen Gefäßen derselben Charge ist nicht erlaubt (die einzige Ausnahme für **IC** ist im Folgenden beschrieben). Unmittelbar nach Gebrauch sind alle Gefäße zu verschließen, um ein Verlust zu vermeiden.
- Bei Verwendung mehrerer Astra Biotech PCR Infektionskits zur Detektion verschiedener Infektionserreger darf die **IC** mit der jüngsten Chargennummer für alle diese verschiedenen Kits verwendet werden.
- Wir empfehlen, vor jeder Analyse ein PCR Protokoll zu erstellen.

- Die PCR Technologie ist sehr empfindlich. Die Amplifikation eines einzelnen DNA Moleküls generiert Millionen identischer Kopien.

Es ist daher ratsam, drei getrennte Arbeitsbereiche einzurichten: a) Proben Aufbereitung und b) PCR Reagenzien-Vorbereitung und c.) PCR-Amplifikation. Jeder Arbeitsbereich benötigt ein eigenes Set an Pipetten und Arbeitsschutzkleidung.

- Sterile Pipettenspitzen und für PCR sterile Filter-Pipettenspitzen zum aerosolfreien Pipettieren nutzen.
- Dieselben Pipettenspitzen nie für zwei verschiedene Komponenten benutzen, weder DNA-frei noch DNA-haltig.
- Routinemäßig sind die Pipetten und der Arbeitsbereich zu dekontaminieren.
- Nach dem Gebrauch sind alle Reagenzien und Komponenten entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien zu entsorgen.
-  Ausgangsmaterialien tierischen Ursprungs, die für die Herstellung der Kitkomponenten verwendet wurden, wurden als nicht gefährlich für den Menschen eingestuft. Da jedoch kein bekannter Labortest die vollständige Abwesenheit von gefährlichen Bestandteilen garantieren kann, sollten alle Kitkomponenten und Patientenproben als potenziell gefährlich behandelt werden.
-  Nach Gebrauch sollten die Kitkomponenten, Proben und alle Verbrauchsmaterialien, die während der Handhabung, Lagerung oder des Assays mit Proben in Berührung gekommen sind (Mikrozentrifugenröhrchen, Fläschchen, Handschuhe, Pipettenspitzen usw.), separat gesammelt und durch Autoklavieren oder Desinfektionsmittel sterilisiert werden. Nach der Sterilisation können alle Komponenten und Verbrauchsmaterialien als nichtgefährlicher Abfall behandelt werden. Andere Komponenten des Kits sollten im herkömmlichen Abfall entsorgt werden.

-  Die folgenden Sicherheitsvorkehrungen sollten getroffen werden:
 - rauchen, essen oder trinken Sie nicht während der Durchführung des Assay;
 - tragen Sie bei der Durchführung des Assays immer Schutzhandschuhe;
 - pipettieren Sie niemals Material mit dem Mund;
 - ein vorsichtiger Umgang mit der **PC** ist nötig, das Spritzen ist zu vermeiden.
 - im Falle eines Verschüttens, wischen Sie das verschüttete Material sofort mit einem geeigneten Aufnahmemedium auf und reinigen den betroffenen Bereich gründlich mit einem geeigneten Desinfektionsmittel.
- Verwenden Sie das Kit unter Beachtung aller generellen und individuellen Regularien der GLP.

11. VERWEISE

Jaton K1, Bille J, Greub G. A novel real-time PCR to detect *Chlamydia trachomatis* in first-void urine or genital swabs // J Med Microbiol. 2006 Dec;55(Pt 12):1667-74.

1. INTENDED USE

The ***Chlamydia trachomatis* PCR kit** is provided for fast and qualitative detection of *Chlamydia trachomatis* DNA in samples extracted from urethral swab specimens, endocervical and vaginal smears, urine samples, by means of Real-Time PCR for diagnosis of *C. trachomatis* presence.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

Detection of ***Chlamydia trachomatis* DNA** includes three stages: DNA extraction, PCR amplification, and data analysis.

At first stage, DNA extraction from specimen with addition of Internal Control **IC** is performed. **IC** is provided with ***Chlamydia trachomatis* PCR kit** and is added to each sample controlling both DNA extraction and PCR amplification stages.

***Chlamydia trachomatis* PCR kit** is used on the second stage in Real-Time PCR to detect the DNA of *C. trachomatis*. During the Real-Time PCR the fragments of *C. trachomatis* DNA and **IC** DNA are both amplified and detected simultaneously.

During PCR increases quantity of amplified fragments of *Chlamydia trachomatis* DNA and **IC** DNA which hybridize to fluorescent reporter probes.

The exonuclease activity of the Taq DNA-polymerase degrades oligonucleotide probes and separates the fluorophore from the quencher, thus cancelling quenching effect and causing emission of fluorescence to be measured by Real-Time PCR cyclers.

Therefore, resulting quantification cycle C_q (threshold cycle C_t or crossing point C_p) is used to determine the presence of target DNA in the sample.

The “hot start” Taq DNA-polymerase, being used in the kit, improves sensitivity and specificity of the test.

3. MATERIALS PROVIDED

3.1 Form S (liquid reaction mix aliquoted into 0.2 mL low profile 8-tube strips; DNA polymerase in a separate tube).

Label	Component	84-09		84-09-56		84-09-24	
		Volume, μ L	Quantity	Volume, μ L	Quantity	Volume, μ L	Quantity
Ct-Mix-S	PCR-Mix <i>C. trachomatis</i> , Form S	10	14×8×0.2 mL tubes	10	7×8×0.2 mL tubes	10	3×8×0.2 mL tubes
Taq	Taq DNA-polymerase	1120	1 tube	560	1 tube	240	1 tube
PC	Positive Control	250	1 tube	250	1 tube	250	1 tube
IC	Internal Control	1120	2 tubes	1120	1 tube	1120	1 tube
NC	Negative Control	1500	1 tube	1500	1 tube	1500	1 tube

The Form S of the product was validated to be used with the following real-time PCR cyclers: CFX96, / Light Cycler 96 (LC 96) and DTprime (corresponds to DTLite, SaCycler, AstraCycler 48 and AstraCycler 96) While using other real-time PCR cyclers compatible with low profile PCR tubes, contact the manufacturer for more information concerning compatibility.

3.2 Form T (liquid reaction mix aliquoted into 0.2 mL regular profile reaction tubes; DNA polymerase in a separate tube).

Label	Component	84-10		84-10-56		84-10-24	
		Volume, μ L	Quantity	Volume, μ L	Quantity	Volume, μ L	Quantity
Ct-Mix-T	PCR-Mix <i>C. trachomatis</i> , Form T	10	112×0.2 mL tubes	10	56×0.2 mL tubes	10	24×0.2 mL tubes
Taq	Taq DNA-polymerase	1120	1 tube	560	1 tube	240	1 tube
PC	Positive Control	250	1 tube	250	1 tube	250	1 tube
IC	Internal Control	1120	2 tubes	1120	1 tube	1120	1 tube
NC	Negative Control	1500	1 tube	1500	1 tube	1500	1 tube

The Form T of the product was validated to be used with the following real-time PCR cyclers: Rotor-Gene Q (corresponds to Rotor-Gene 3000/6000). While using other real-time PCR cyclers compatible with regular profile PCR tubes, contact the manufacturer for more information concerning compatibility.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Biosafety cabinet;
- Real-Time PCR cycler: CFX-96 , DTprime (corresponds to DTlite, SaCycler, AstraCycler 48 and AstraCycler 96), Light Cycler 96, Rotor-Gene Q (corresponds to Rotor-Gene 3000/6000);
- Vortex mixer;
- Microcentrifuge (suitable for 0.2 mL tubes, max. 2400 rpm);
- two separate pipette sets for DNA-free and DNA-containing components;
- Filter tips (10, 100; 200 and 1000 µL);
- Disposable safe-seal 1.5 mL microcentrifuge tubes
- Separate working areas for DNA extraction (Sample preparation area), PCR preparation (Reagent preparation area) and for Real-Time PCR amplification (Amplification area). Each area must be fitted with separate set of pipettes, instruments and laboratory clothing.
- Multi DNA extraction kit (Ref 80-01) or Rapid DNA Extraction kit (Ref 80-02).

5. STORAGE CONDITIONS AND STABILITY OF THE KIT

The kits are designed to perform 112 (Ref. 84-09/10), 56 (Ref. 84-09-56/10-56) or 24 (Ref. 84-09-24/10-24) reactions, including controls.

***Chlamydia trachomatis* PCR kit** should be stored at -18...-30 °C, preferably in the original kit box until the expiration date. The manufacturer guarantees the functionality of the kit components up to a number of 15 freezing and thawing cycles.

. The expiry date of the kit is stated on the box label, expiry date for each component is indicated on the respective label. Storage at +25 °C is allowed for no more than 7 days (any kit format).

6. SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND TRANSPORT

Total DNA can be extracted from urethral swab specimens, endocervical and vaginal smears, urine samples.

Type of specimen	Collection*	Storage-Transport**
urethral swab, endocervical and vaginal smears	Specimens collected and transported in 0,5 mL of 0.9 % NaCl solution or other transport medium entitled for this purposes	• At +18...+25 °C for ≤ 48 hours • Refrigerated at 2-8°C for ≤ 4 days • Frozen at -18...-35 °C > 4 days
Urine	first 10 mL to 50 mL of urine, obtained ideally between 2 h and 6 h after the last micturition in a sterile screw-cap container without preservative	• At +18...+25 °C for ≤ 48 hours • Refrigerated at 2-8°C for ≤ 2 weeks • Frozen at -18...-35 °C > 2 weeks

*Standard collection procedures are appropriate to obtain specimens.

**Ensure that the transport of human specimens meets all local and national regulations for the transport of etiologic agents.

7. ASSAY PROCEDURE

Positive and Negative Controls must be included in each run.

The complete procedure consists of three stages:

- I. DNA Extraction
- II. Real-Time PCR
- III. Data analysis and interpretation

I. DNA extraction

NOTE: *The quality of the extracted DNA has a profound impact on the performance of the entire test system. It has to be ensured that the system used for DNA extraction is compatible with real-time PCR technology. Chlamydia trachomatis PCR kit was validated with the following kits and systems for DNA extraction, which are strongly recommended by the manufacturer:*

- Multi DNA extraction kit (Astra Biotech, Ref 80-01)
- Rapid DNA Extraction kit (Astra Biotech, Ref 80-02)

The compatibility of other DNA extraction procedure for use with Chlamydia trachomatis PCR kit has to be validated by the user.

- 1) Take **IC** out from the kit to thaw at room temperature, the rest components place back in the freezer. Gently vortex **IC** and centrifuge for 2-3 s.
- 2) Prepare and mark required quantity of 1.5 mL microcentrifuge tubes equal to the number of samples + 1 tube for negative extraction control and label as “NEC”.

NOTE: *In case of using Rapid DNA Extraction kit, prepare and mark required quantity of 1.5 mL microcentrifuge tubes with lysis buffer from the extraction kit.*

NOTE: *Each extraction procedure should be performed using “NEC”.*

3) If Astra Biotech DNA extraction kit is used, ignore steps 4) - 6) and follow the Astra Biotech DNA extraction kit manual; otherwise continue with step 4).

4) Place **20 µL IC** into **each** 1.5 mL microcentrifuge **tube**.

5) Add **100 µL NC** into the microcentrifuge **tube marked “NEC”**.

NOTE: *The Elution buffer contained in DNA extraction kit can be used instead of **NC**.*

6) Follow the manual of the used DNA extraction kit.

II. Real-Time PCR

Kit components preparation:

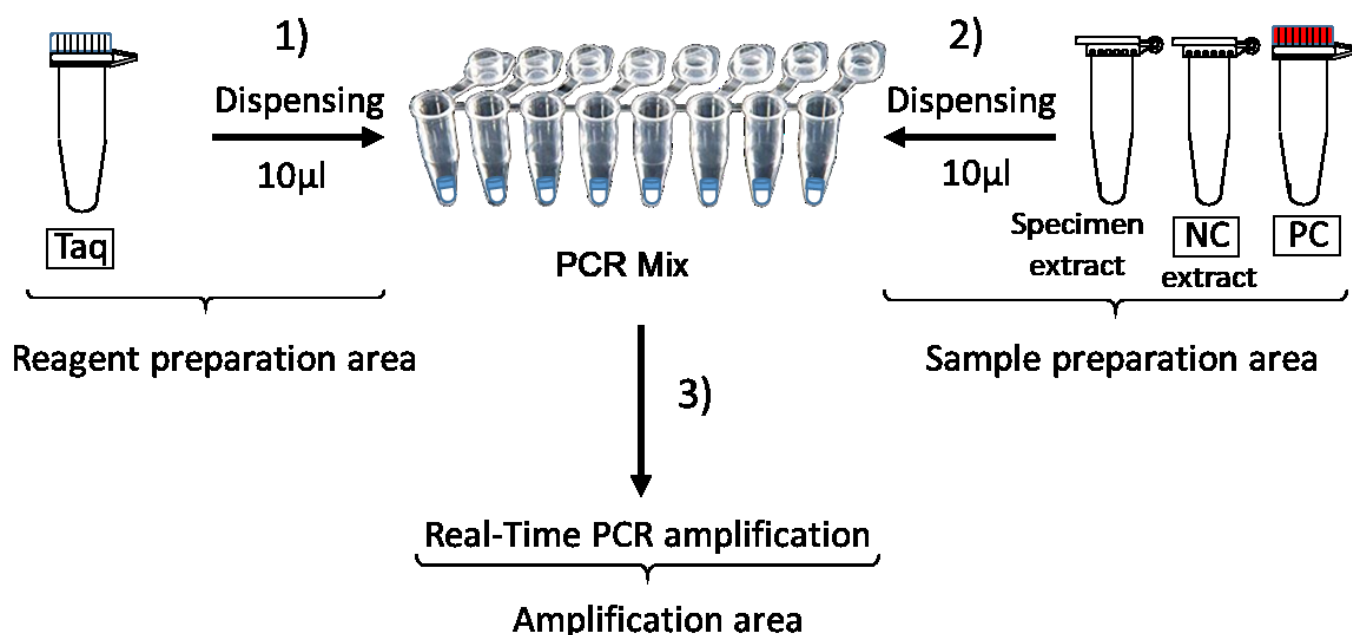
1) Take out from the freezer and thaw the following components of the kit:

- **PC** (positive control)
- **Taq** (Taq polymerase)
- required quantity of 0.2 mL microcentrifuge tubes/wells with **Ct-Mix-S/T** equal to the number of samples + 1 tube/ well for “PC” + 1 tube/well for “NEC”.

The rest components place back in the freezer.

2) Hand over **PC** to the Sample preparation area intended for DNA extraction and its dispensing.

Workflow



1) PCR mix preparation

NOTE: PCR mix preparation has to be performed in the Reagent preparation area. Do not prepare the PCR mix in the same area as the DNA extraction or amplification to prevent DNA contamination.

1. Mark prepared PCR tubes with **Ct-Mix-S/T**.

NOTE: Different positions for marking the tubes are necessary because of differences in the fluorescence detection: When using CFX96/96 Touch, LC96 or SaCycler (DTprime) Real-Time PCR cyclers mark tubes outside the center of tube cap or on the tube side. When using Rotor-Gene Q instruments mark the tubes on the caps.

2. Gently vortex **Taq** and centrifuge at 1500-2400 rpm for 2-3 s.
3. Place 10 µl of **Taq** into each tube avoiding tip contact with paraffin.

2) Dispensing of test samples and the controls

NOTE: Dispensing of test samples and the controls have to be performed in the Sample preparation area.

NOTE: Use a separate filter tip for each DNA sample.

1. Centrifuge the DNA extracted from the specimens and “NEC” (**NC** extract) at 13000 rpm for 1 min just before adding them to the PCR tubes.
2. Add 10 µl of DNA extracted from specimens and “NEC” to separate PCR tubes avoiding tip contact with paraffin.
3. Vortex and centrifuge the **PC** at 1500-2400 rpm for 2-3 s.
4. Add 10 µL of **PC** to the PCR tube marked “PC”.
5. Close the tubes and centrifuge at 1500-2400 rpm for 2-3 s.

3) Real-Time PCR Amplification:

NOTE: *Real-Time PCR Amplification has to be performed in the Amplification area. Separate room for this area is recommended.*

- Load tubes into a Real-Time PCR cycler.
- Fill in the location of the samples. Set up fluorescent detection on the channels ROX/ Orange and FAM/ Green.
- Run the PCR protocol.

Stage	Temperature, °C	Data collection	Time	Number of cycles
Hold	94	-	3 min	1
Cycling	94	-	10 s	5
	60		20 s	
Cycling	94	-	10 s	45
	60	ROX/ Orange FAM/ Green	20 s	

- Follow the manufacturer instruction before using the PCR Real-Time cycler.

III. Data Analysis

1) General conditions:

ROX dye is used to detect the *Chlamydia trachomatis* DNA and FAM is used to detect the **IC** DNA.

Analysis of the results can be performed by means of a Real-Time PCR thermal cycler's software in accordance to its instruction. For the validated cyclers detailed instructions concerning protocol set up and results analysis are given in «Astra Biotech: Real-Time PCR kits Guidelines».

Analysis of the results can be performed only by using following parameters: Cq **Ct**, Cq **PC** and Cq **IC**, specified for each lot in the Quality control Sheet provided with every kit.

Cq **Ct** = critical value of quantification cycle for *C. trachomatis* in the ROX channel, is crucial for detection positive results;

Cq **PC** = critical value of quantification cycle for Positive Control (PC) in the ROX channel is used to determine whether kit components work properly (general control of the reagents effectiveness), is crucial for detection negative results

Cq **IC** = critical value of quantification cycle for Internal Control (IC) in the FAM channel is used to control all stages of the analysis (overall effectiveness) in each tube, including inhibition and DNA loss.

The results of single run are valid if:

- Cq PC $\leq$ Cq **PC** in the ROX channel. Nevertheless, if Cq value for PC is determined as $>$ Cq **PC**, in that case all the specimens defined as positive in this run should be considered as valid, whereas all the specimens defined as negative should be considered as invalid.
- Cq of NEC $>$ Cq **Ct** in the ROX channel and Cq of NEC $\leq$ Cq **IC** in the FAM channel, but there are some exclusions, for more information see 2).

2) Data interpretation

Specimen is considered as positive on DNA of *C. trachomatis*:

$Cq \leq Cq_{Ct}$ in the ROX channel,
even if $Cq > Cq_{IC}$ in the FAM channel or is not determined.

Specimen is considered as negative on DNA of *C. trachomatis*:

$Cq > Cq_{Ct}$ in the ROX channel or is not determined

$Cq \leq Cq_{IC}$ in the FAM channel,

$Cq_{PC} \leq Cq_{PC}$ in the ROX channel.

Specimen is considered as invalid:

$Cq > Cq_{Ct}$ in the ROX channel and at least one of this conditions are satisfied:

- $Cq > Cq_{IC}$ in the FAM channel or is not determined.
- $Cq_{PC} > Cq_{PC}$ in the ROX channel or is not determined.

In case of contamination:

$Cq_{NEC} \leq Cq_{Ct}$ in the ROX channel. Measures must be taken to eradicate the source of contamination. In case of contamination, all positive specimens satisfying condition $Cq \geq (Cq_{NEC} - 5)$ in the ROX channel are considered as invalid, the other results are considered as valid. For all specimens with invalid results it is recommended to perform the analysis from the DNA extraction stage.

Data interpretation, summary table:

Cq ROX Detection of <i>C.t.</i> DNA for sample	Cq FAM Detection of IC DNA for sample	Cq ROX Detection of <i>C.t.</i> DNA for PC	Cq ROX Detection of <i>C.t.</i> DNA for NEC	Result
$Cq \leq Cq_{Ct}$	any	any	$Cq > Cq_{Ct}$ or N/A	Positive
$Cq > Cq_{Ct}$ or N/A	$Cq \leq Cq_{IC}$	$Cq \leq Cq_{PC}$	any	Negative
$Cq > Cq_{Ct}$ or N/A	$Cq > Cq_{IC}$ or N/A	any	any	Invalid
$Cq > Cq_{Ct}$ or N/A	any	$Cq > Cq_{PC}$ or N/A	any	
$Cq \leq Cq_{Ct}$ and $Cq > Cq_{NEC} - 5$	any	any	$Cq \leq Cq_{Ct}$	
$Cq \leq Cq_{Ct}$ and $Cq \leq Cq_{NEC} - 5$	any	any	$Cq \leq Cq_{Ct}$	Positive

Abbreviations:

Cq_{Ct} critical value of quantification cycle for *Chlamydia trachomatis*

Cq_{IC} critical value of quantification cycle for Internal Control (IC)

Cq_{PC} critical value of quantification cycle for Positive Control (PC)

Cq_{Ct} , Cq_{IC} , Cq_{PC} are specified for each lot in the Quality control Sheet provided with every kit

NEC negative extraction control

Cq of NEC quantification cycle for NEC in the ROX channel is determined in case of contamination

N/A Cq value is not determined

8. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE KIT

Analytical sensitivity:

The detection limit of the kit evaluated via probit analysis is 600 copies of *C. trachomatis* genomic DNA per 1 mL (i.e. 10 copies of genomic DNA per reaction). This limit is defined for confidence level 95%. It is assumed that 100 µl of specimen was sampled for DNA extraction and elution volume was 60 µl.

Analytical specificity:

A false-positive reaction is absent with standard human DNA samples and standard DNA samples of *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria flava*, *Neisseria subflava*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria sicca*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, *Candida albicans*, HSV type 1 and 2, CMV and HPV.

9. LIMITATIONS OF THE METHOD

Any clinical diagnosis should not be based on the results of *in vitro* diagnostic methods alone. For diagnosis establishment a physician is supposed to consider all the available clinical and laboratory findings.

10. SAFETY PRECAUTIONS

- **This kit is for in vitro diagnostic use only.** The operator should thoroughly follow the manual to obtain reliable data. This instruction manual is valid only for the present kit with the listed contents. Any exchange of the kit components is not allowed by CE regulations.
- Test should only be performed by skilled personnel considering GLP (Good Laboratory Practice) guidelines.
- Don't use the kit after its expiration date.

- Do not pool reagents from different lots or from different tubes of the same lot (the only exception for **IC** is described below). Immediately after use, close all tubes in order to avoid leakage.
- In case of simultaneous using of two or more Astra Biotech Infectious Real-Time PCR kits for detection of different infectious agents, **IC** with the latest lot number can be used for all of these kits.
- We recommend setting up blank protocols of PCR before the analysis.
- PCR technology is extremely sensitive. The amplification of a single DNA molecule generates millions of identical copies. Therefore, set up three separate working areas for a) sample preparation b) PCR reagent preparation and c) PCR amplification. For each working area a different set of pipettes and protective clothing should be reserved.
- Use sterile filter tips for pipetting and use special PCR pipettes for aerosol free pipetting.
- Do not use the same tip for two different components, neither DNA-free nor DNA containing.
- Routinely decontaminate your pipettes and the laboratory benches.
- After usage, all the reagents and test components should be discarded as consisted with local statements.
-  Source materials of animal origin used for kit components preparation were found safe for humans. However, none of known laboratory test guarantees total absence of the hazard agents. Therefore, all kit components and patient's samples should be handled as potentially hazardous.
-  After usage the kit components, specimens and all consumables which contacted with specimens during handling, storage or assay (tubes, vials, gloves, pipette tips etc.) should be collected separately and sterilized by autoclaving or disinfectant treatment. After sterilization all components and expendable materials may be utilized as non-dangerous garbage. Other

components of the kit should be discarded into conventional garbage.

-  The following precautions should be taken:
 - do not smoke, eat or drink while performing the assay;
 - always use protective gloves while performing the assay;
 - never pipette material by mouth;
 - be careful while handling **PC**, avoid its splashing;
 - in case of spilling, wipe up the spills promptly and wash affected area thoroughly using decontaminant.
- GLP including all general and individual regulations should be applied for the kit usage.

11. REFERENCE

Jaton K1, Bille J, Greub G. A novel real-time PCR to detect *Chlamydia trachomatis* in first-void urine or genital swabs // J Med Microbiol. 2006 Dec;55(Pt 12):1667-74.

April, 03, 2019



ASTRA
BIOTECH



Astra Biotech GmbH
Rudower Chaussee 29
12489 Berlin, Germany
Telefon: +49 (0) 30 74696509
E-Mail: info@astrabiotech.de
www.astrabiotech.de