



# ***Neisseria gonorrhoeae* PCR kit**

**Real-Time PCR Testkit zur Detektion von *Neisseria gonorrhoeae* DNA**

(Gebrauchsanweisung: Seite 5)

**Real Time PCR test for detection of *Neisseria gonorrhoeae* DNA**

(Instructions for use: page 19)



**Form S 84-03**





















**Form T 84-04**



**112 Untersuchungen**  
**112 tests**



## 1. KENNZEICHEN / SYMBOLS LEGEND

	In Vitro Diagnostika In Vitro Diagnostic Medical Device		EG-Konformitätserklärung EC Declaration of Conformity
	Bestellnummer Catalogue number		Chargenbezeichnung Batch code
	Verwendbar bis Use by		Hersteller Manufacturer
	Herstellungsdatum Date of manufacture		Gebrauchsanweisung beachten Consult operating instructions
	Achtung, Begleitdokumente beachten Caution, consult accompanying documents		Temperaturbegrenzung Temperature limitation
	Ausreichend für <112> Prüfungen Contains sufficient for <112> tests		PCR-Mix <i>N. gonorrhoeae</i> , Form S
	Taq DNA Polymerase Taq DNA-polymerase		PCR-Mix <i>N. gonorrhoeae</i> , Form T
	Negativkontrolle Negative Control		Positivkontrolle Positive Control
	Negativkontrolle Negative Control		Interne Kontrolle Internal Control
	Lichtgeschützt Protect from light		Trocken halten Keep dry



## 2. VERWENDUNGSZWECK

Der ***Neisseria gonorrhoeae* PCR Testkit** ist für eine schnelle und qualitative Detektion von *Neisseria gonorrhoeae* DNA in Extrakten aus Abstrichen der urethralen, endozervikalen und vaginalen Schleimhaut, Urinproben, Prostatasekret und anderen humanen Körperflüssigkeiten sowie Gewebeproben mittels Real-Time PCR bestimmt zur Detektion von *Neisseria gonorrhoeae* Infektion.

## 3. TESTPRINZIP

Die Detektion der *Neisseria gonorrhoeae* DNA 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 ***Neisseria gonorrhoeae* PCR Testkit** enthalten und wird jeder Probe -zur Kontrolle der DNA Extraktion und PCR Amplifizierungsschritte- zugegeben.

Darauffolgend wird die *Neisseria gonorrhoeae* DNA mit der Real-Time PCR im zweiten Schritt detektiert. Während der Real-Time PCR werden sowohl Fragmente genomischer DNA von *Neisseria gonorrhoeae* als auch der **IC** DNA amplifiziert und gleichzeitig detektiert.

Die Amplifikation führt zu einem quantitativen Anstieg der Amplifikate von *Neisseria gonorrhoeae* 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.

## 4. PACKUNGSINHALT

### 4.1 Format S (Flüssige Reaktionsmische aliquotiert in 0.2 ml 8-Well-Streifen, DNA Polymerase separat)

Label	Komponente	Volumen, µl	Anzahl
<b>Ng-Mix-S</b>	PCR Mix <i>N. gonorrhoeae</i> , Format S	10	14x 8×0.2 ml
<b>Taq</b>	Taq DNA Polymerase	1120	1 Röhrchen
<b>PC</b>	Positivkontrolle	250	1 Röhrchen
<b>IC</b>	Interne Kontrolle	1120	2 Röhrchen
<b>NC</b>	Negativkontrolle	1500	1 Röhrchen

Dieses Format ist kompatibel mit den PCR Amplifaktoren: CFX96/ CFX96 Touch, SaCycler, Light Cycler 96 und anderen Amplifaktoren, die mit flachen Röhrchen kompatibel sind.

## 4 2 Format T (Flüssige Reaktionsmische aliquotiert in 0.2 mL Röhrchen, DNA Polymerase separat)

Label	Komponente	Volumen, µl	Anzahl
<b>Ng-Mix-T</b>	PCR-Mix N. gonorrhoeae, Format T	10	112×0,2 ml Röhrchen
<b>Taq</b>	Taq DNA Polymerase	1120	1 Röhrchen
<b>PC</b>	Positivkontrolle	250	1 Röhrchen
<b>IC</b>	Interne Kontrolle	1120	2 Röhrchen
<b>NC</b>	Negativkontrolle	1500	1 Röhrchen

Dieses Format ist kompatibel mit den PCR Amplifaktoren: Rotor-Gene 3000/6000 und, Rotor-Gene Q und anderen Amplifaktoren, die mit Standard Röhrchen kompatibel sind.

## 5. ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN UND EQUIPMENT

- Biosicherheitskammer;
- Real-Time PCR Thermocycler;
- 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, PCR Präparation und PCR Amplifikation mit je eigenem Pipettensatz, Equipment und Laborkleidung.

## 6. LAGERUNG UND STABILITÄT DES TESTKITS

Der Testkit ist für 112 Reaktionen inklusive der Kontrollen bestimmt.

Der ***Neisseria gonorrhoeae* PCR kit** sollte bei -18...-30°C, vorzugsweise in der Originalverpackung bis zum Verfallsdatum gelagert werden.

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).

## 7. PROBEN

Gesamt DNA kann aus Abstrichen der urethralen, endozervikalen und vaginalen Schleimhaut, Urinproben, Prostatasekret und anderen humanen Körperflüssigkeiten sowie Gewebeproben extrahiert werden. Es können alle Extraktionsmethoden genutzt werden.

## 8. TESTDURCHFÜHRUNG

Positive und negative Kontrollen müssen bei jedem Lauf mitgeführt werden.

Der komplette Ablauf besteht aus drei Schritten:

1. DNA Extraktion
2. Real-Time PCR
3. Datenanalyse und Interpretation



## 1. DNA Extraktion

**ANMERKUNG:** Die Anwendung der Astra Biotech DNA Extraktionskits zur Probenvorbereitung wird ausdrücklich empfohlen.

**1.1** **IC** herausnehmen und restliche Komponenten zurück in den Kühlschrank stellen. **IC** bei Raumtemperatur auftauen, vorsichtig vortexen und vor Gebrauch 2- 3 s zentrifugieren.

**1.2** 1,5 ml Reaktionsgefäße entsprechend der Probenanzahl bereitstellen + 1 Röhrchen für die Negative Extraktionskontrolle vorbereiten und mit „NEC“ markieren.

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

**1.3** Bei Verwendung eines Astra Biotech DNA Extraktionskits Schritte 1.4 bis 1.6 ignorieren und der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits folgen, sonst mit 1.4 fortsetzen.

**1.4** 20 µl **IC** in jedes 1,5 ml **Reaktionsgefäß** pipettieren.

**1.5** 100 µl **NC** in das mit “NEC” markierte Gefäß geben.

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

**1.6** Der Gebrauchsanweisung des jeweiligen Extraktionskits folgen.

**ANMERKUNG:** Das Elutionsvolumen sollte 200 µl nicht überschreiten.

## 2. Real-Time PCR

### 2.1 Vorbereitung der Kitkomponenten:

- Testkit aus dem Kühlschrank nehmen, flüssige Komponenten auftauen, vortexen und kurz zentrifugieren.

### 2.2 Vorbereitung der Mikrozentrifugenröhrchen:

- Benötigte Menge 0,2 ml Mikrozentrifugenröhrchen /Kavitäten **Ng-Mix-S/T** entsprechend der Probenanzahl bereitstellen und markieren + 1 Röhrchen/ Kavität für „PC“ (Positivkontrolle) + 1 Röhrchen/ Kavität für „NEC“ (Negative Extraktionskontrolle).

**ANMERKUNG:** *Unterschiedliche Positionen für die Beschriftung der Röhrchen sind aufgrund unterschiedlicher Arten der Fluoreszenzdetektion nötig: Bei Verwendung der Real-Time PCR Thermocycler CFX96/, 96 Touch, LC 96 oder SaCycler sind die Röhrchen außerhalb der Deckelmitte oder am Röhrchenrand zu markieren. Bei Verwendung der Real-Time PCR Thermocycler Rotor-Gene Q/ 3000/ 6000 sind die Röhrchen auf dem Deckel zu markieren.*

- **10 µl Taq** in jedes 0,2 ml **Röhrchen/ Kavität** pipettieren, dabei Paraffin-Kontakt vermeiden.
- **10 µl DNA** (extrahiert aus Patientenprobe und „NEC“) hinzufügen (Paraffin-Kontakt vermeiden).
- **10 µl** Positivkontrolle **PC** in mit „PC“ markierte **Röhrchen/ Kavität** pipettieren.
- Für jede Probe eine separate Filterspitze verwenden.
- Gefäße schließen.
- Vortexen und bei **1500-2400 rpm für 2-3 s zentrifugieren.**

### 2.3. Real-Time PCR:

- Röhrchen/ Platte in den Real-Time PCR Thermocycler stellen.
- Platteninformation eingeben. Einrichten der Fluoreszenzdetektion mit den Kan len ROX / Orange und FAM / Grün.
- PCR Protokoll starten:

Schritt	Temperatur, �C	Daten Erhebung	Zeit	Anzahl 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	

## 3. Datenanalyse

### 3.1. Allgemeines:

Quantifizierungszyklen (= Cq) werden in allen Proben sowohl für FAM als auch ROX bestimmt. Der ROX-Farbstoff wird für die Detektion der *Neisseria gonorrhoeae* (*N.g.*) DNA und FAM für die Detektion der **IC** DNA genutzt.

Die Analyse kann mit der PCR Thermocycler internen Software gem  f 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:  $Cq$  **Ng**,  $Cq$  **PC** und  $Cq$  **IC**, spezifiziert im Qualitätskontrolldatenblatt zum Produkt.

$Cq$  **Ng** = kritischer Wert des Quantifizierungszyklus für *Neisseria gonorrhoeae* 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:**

$Cq$  PC  $\leq$   $Cq$  **PC** im ROX Kanal

Wenn  $Cq$  PC  $>$   $Cq$  **PC** (Datenblatt) können alle im Lauf positiv gewerteten Proben als gültig betrachtet werden, alle negativ gewerteten Proben hingegen als ungültig.

$Cq$  NEC  $>$   $Cq$  **Ng** im ROX Kanal und

$Cq$  NEC  $\leq$   $Cq$  **IC** im FAM Kanal

(Ausnahmen beachten bei Kontamination, siehe 3.2)

### 3.2 Interpretation der Daten:

#### **Proben gelten als positiv für *Neisseria gonorrhoeae* DNA:**

$Cq \leq Cq$  **Ng** im ROX Kanal,

selbst wenn  $Cq > Cq$  **IC** im FAM Kanal oder nicht bestimmt

#### **Proben gelten als negativ für *Neisseria gonorrhoeae* DNA:**

- $Cq > Cq$  **Ng** im ROX Kanal
- $Cq \leq Cq$  **IC** im FAM Kanal
- Für PC:  $Cq \leq Cq$  **PC** im ROX Kanal

#### **Proben gelten als ungültig:**

$Cq > Cq$  **Ng** im ROX Kanal und entweder

$Cq > Cq$  **IC** im FAM Kanal oder unbestimmt

Für PC in the ROX channel  $Cq > Cq$  **PC** oder unbestimmt

#### **Eine Kontamination ist präsent:**

$Cq_{NEC} < Cq$  **Ng** im ROX Kanal

In diesem Fall sollten alle Maßnahmen getroffen werden, um die Ursache der Kontamination zu eliminieren. Beim Vorliegen einer Kontamination alle Proben, die als positiv in diesem Lauf detektiert wurden, sind 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 <b>ROX</b> Detektion der <i>N.g.</i> DNA in einer Probe	Cq <b>FAM</b> Detektion der <b>IC</b> DNA in einer Probe	Cq <b>ROX</b> Detektion der <i>N.g.</i> DNA in <b>Positiv-</b> <b>kontrolle</b>	Cq <b>ROX</b> Detektion der <i>N.g.</i> DNA in <b>Negativ-</b> <b>kontrolle</b>	Ergebnis
$Cq \leq Cq_{Ng}$	alle	alle	$Cq > Cq_{Ng}$ oder N/A	Positiv
$Cq > Cq_{Ng}$ oder N/A	$Cq \leq Cq_{IC}$	$Cq \leq Cq_{PC}$	alle	Negativ
$Cq > Cq_{Ng}$ oder N/A	$Cq > Cq_{IC}$ oder N/A	any	alle	Ungültig
$Cq > Cq_{Ng}$ oder N/A	alle	$Cq > Cq_{PC}$ oder N/A	alle	
$Cq \leq Cq_{Ng}$ und $Cq > Cq_{NEC} - 5$	alle	alle	$Cq \leq Cq_{Ng}$	Positiv
$Cq \leq Cq_{Ng}$ und $Cq \leq Cq_{NEC} - 5$	alle	alle	$Cq \leq Cq_{Ct}$	

### Abkürzungen:

$Cq_{Ng}$  = kritischer Wert des Quantifizierungszyklus für *Neisseria gonorrhoeae*

$Cq_{IC}$  = kritischer Wert des Quantifizierungszyklus der Internen Kontrolle

$Cq_{PC}$  = kritischer Wert des Quantifizierungszyklus der Positivkontrolle

$Cq_{NEC}$  = kritischer Wert des Quantifizierungszyklus der Negativkontrolle im ROX Kanal

N/A = *Cq Wert wurde nicht bestimmt*

## 9. TESTCHARAKTERISTIKA

### Analytische Sensitivität:

Das Detektionslimit des Testkits wurde via Probitanalyse ermittelt und beträgt 180 Kopien der genomischen DNA von *Neisseria gonorrhoeae* pro 1 ml (3 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 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*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria flava*, *Neisseria subflava*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria sicca*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, *Candida albicans*, HSV type 1 and sowie CMV und HPV konnten nicht nachgewiesen werden.

## 10. 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.

## 11. 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 den vorliegenden 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.
- Im Labor nicht essen, trinken oder rauchen.
- Ein vorsichtiger Umgang mit der Positivkontrolle **PC** ist nötig, das Spritzen ist zu vermeiden.
- Testkits, kontaminiert mit *Neisseria gonorrhoeae* DNA/ **PC** sind im infektiösen Müll zu entsorgen.
- 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.



## 2. INTENDED USE

The ***Neisseria gonorrhoeae* PCR kit** is provided for fast and qualitative detection of *Neisseria gonorrhoeae* DNA in samples extracted from urethral swab specimens, endocervical and vaginal smears, urine samples, prostatic fluid specimens and other human body fluids and tissue samples by means of Real-Time PCR for diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* presence.

## 3. PRINCIPLE OF TEST

The detection of the ***Neisseria gonorrhoeae* 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 ***Neisseria gonorrhoeae* PCR kit** and is added to each sample controlling both DNA extraction and PCR amplification stages.

The second stage is the Real-Time PCR to detect the DNA of *Neisseria gonorrhoeae*. During the Real-Time PCR the fragments of *Neisseria gonorrhoeae* genomic DNA and **IC** DNA are both amplified and detected simultaneously. During PCR increases quantity of amplified fragments of *Neisseria gonorrhoeae* DNA and **IC** DNA which hybridize to fluorescent reporter probes.

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

Therefore, resulting quantification cycle C<sub>q</sub> (threshold cycle (C<sub>t</sub>) or crossing point (C<sub>p</sub>)) is used to determine the presence of target DNA in the sample.

The “hot start” Taq DNA-polymerase **Taq** improves sensitivity and specificity of the test.

## 4. MATERIALS PROVIDED

**4.1 Form S** (liquid reaction mix aliquoted into 0.2 mL low profile 8-tube strips and separate DNA polymerase)

Label	Component	Volume, $\mu\text{L}$	Quantity
<b>Ng-Mix-S</b>	PCR-Mix <i>N. gonorrhoeae</i> , Form S	10	14x 8 ×0.2 mL tubes
<b>Taq</b>	Taq DNA polymerase	1120	1 tube
<b>PC</b>	Positive Control	250	1 tube
<b>IC</b>	Internal Control	1120	2 tubes
<b>NC</b>	Negative Control	1500	1 tube

The format is compatible with the following amplifiers: CFX96/CFX96 Touch, SaCycler, Light Cycler 96 and other Real-Time PCR cyclers compatible with low profile PCR tubes.

#### 4.2 Form T (liquid reaction mix aliquoted into 0.2 mL regular profile reaction tubes and separate DNA polymerase)

Label	Component	Volume, $\mu\text{L}$	Quantity
<b>Ng-Mix-T</b>	PCR-Mix <i>N. gonorrhoeae</i> , Form T	10	112× 0.2 mL tubes
<b>Taq</b>	Taq DNA - polymerase	1120	1 tube
<b>PC</b>	Positive Control	250	1 tube
<b>IC</b>	Internal Control	1120	2 tubes
<b>NC</b>	Negative Control	1500	1 tube

The format is compatible with the following amplifiers: Rotor-Gene Q/ 3000/ 6000 and other Real-Time PCR cyclers compatible with regular profile PCR tubes.

### 5. MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Biosafety cabinet;
- Real-Time PCR cyclers;
- Vortex mixer;
- Microcentrifuge (suitable for 0.2 mL tubes, max. 2400 rpm);
- 2 separate pipette sets for DNA-free and DNA-containing components;
- Filter tips (10, 100; 200 and 1000  $\mu\text{L}$ );
- Disposable safe-seal 1.5 mL microcentrifuge tubes;
- Separate working areas for DNA extraction, PCR preparation and PCR amplification each with set of pipettes, instruments and laboratory clothing.

## 6. STORAGE CONDITIONS AND STABILITY OF THE KIT

The kit is designed to perform 112 reactions, including controls.

***Neisseria gonorrhoeae* PCR kit** should be stored at -18...-30°C, preferably in the original kit box until the expiration date. 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).

## 7. SAMPLES

Total DNA can be extracted from urethral swab specimens, endocervical and vaginal smears, urine samples, prostatic fluid specimens and other human body fluids and tissue samples. All methods of extraction can be used.

## 8. ASSAY PROCEDURE

Positive and Negative Controls must be included in each run.

The complete procedure consists of three stages:

1. DNA Extraction
2. Real-Time PCR
3. Data analysis and interpretation

## 1. DNA extraction

**NOTE:** Application of Astra Biotech DNA extraction kits for specimen preparation is strongly recommended.

- 1.1 Take **IC** to thaw at room temperature and place the rest components back in freezer. Gently vortex **IC** and centrifuge for 2-3 s.
- 1.2 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:** Each extraction procedure should be performed using “NEC”.

- 1.3 If Astra Biotech DNA extraction kit is used, ignore steps 1.4-1.6 and follow the Astra Biotech DNA extraction kit manual; otherwise continue with step 1.4.
- 1.4 Place **20 µL IC** into each 1.5 mL microcentrifuge tube.
- 1.5 Add **100 µL NC** into the microcentrifuge tube marked “NEC”.

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

- 1.6 Follow the manual of respective DNA extraction kit.

**NOTE:** Elution volume should not exceed 200 µL.

## 2. Real-Time PCR

### 2.1 Kit components preparation:

- Take the kit out from the refrigerator, thaw all liquid components.
- Gently vortex all liquid components and centrifuge briefly.

### 2.2 Microcentrifuge tubes preparation:

- Prepare and mark required quantity of 0.2 mL microcentrifuge tubes/ wells **Ng-Mix-S/T** equal to the number of samples + 1 tube/ well for “PC” + 1 tube/ well for “NEC”.

**NOTE:** *Different positions for marking the tubes are necessary because of differences in the fluorescence detection: When using CFX96/ 96 Touch, LC 96 or SaCycler Real-Time PCR cyclers mark tubes outside the centre of tube cap or on the tube side. When using Rotor-Gene Q/ 3000/ 6000 instruments mark the tubes on the caps.*

- Place **10 µl Taq** into each tube avoiding tip contact with paraffin.
- Add **10 µl DNA** (extracted from specimens and “NEC”) avoiding tip contact with paraffin.
- Add **10 µL positive control PC** in the PCR tube marked “PC”. Use separate filter tip for each sample.
- Close the tubes.
- Vortex, then centrifuge at 1500-2400 rpm for 2-3 s.



### 2.3 Real-Time PCR Amplification:

- Place tubes/ plate into the Real-Time PCR cycler.
- Fill in the location of the samples. Set up fluorescent detection from 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	

## 3. Data Analysis

### 3.1 General conditions:

ROX dye is used to detect the *Neisseria gonorrhoeae* DNA and FAM is used to detect **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 **Ng**, Cq **PC** and Cq **IC**, specified in the Quality control Sheet enclosed in every kit.

Cq **Ng** critical value of quantification cycle for *Neisseria gonorrhoeae* in the ROX channel, 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), 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 NEC  $>$  Cq **Ng** in the ROX channel and

Cq NEC  $\leq$  Cq **IC** in the FAM channel,

but there are some exclusions, for more information see 3.2.

### 3.2 Data interpretation

#### **Specimen is considered as positive on DNA of *Neisseria g.*:**

$Cq \leq Cq_{Ng}$  in the ROX channel,

even if  $Cq > Cq_{IC}$  in the FAM channel or is not determined.

#### **Specimen is considered as negative on DNA *Neisseria g.*:**

- $Cq > Cq_{Ng}$  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:**

$Cq > Cq_{Ng}$  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:**

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

$Cq_{Ng}$  = *critical value of quantification cycle for Neisseria gonorrhoeae*

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

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

NEC = *negative extraction control*

$Cq_{NEC}$  = *quantification cycle for NEC in the ROX channel is determined in case of contamination*

N/A = *Cq value is not determined*

## 9. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE KIT

### Analytical sensitivity:

The detection limit of the kit evaluated via probit analysis is 180 copies of *Neisseria gonorrhoeae* genomic DNA per 1 mL (3 copies of genomic DNA per reaction). This limit is defined for confidence level of 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*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Neisseria flava*, *Neisseria subflava*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria sicca*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, *Candida albicans*, *HSV type 1 and 2*, *CMV* and *HPV*.

## 10. 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.

## 11. 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.

- Do not eat, drink or smoke in the laboratory work area.
- Be careful while handling Positive Control, avoid its splashing.
- Kits contaminated with *Neisseria gonorrhoeae* DNA/ **PC** should be discarded in a biological waste container.
- Routinely decontaminate your pipettes and the laboratory benches.
- After usage, all the reagents and test components should be discarded as consisted with local statements.

September 24, 2018



Astra Biotech GmbH  
Rudower Chaussee 29  
12489 Berlin, Germany  
Telefon: +49 (0)30 74 696 509  
E-Mail: [info@astrabiotech.de](mailto:info@astrabiotech.de)  
[www.astrabiotech.de](http://www.astrabiotech.de)