

Gebrauchsinformation / Instructions for use

OdontoPlex™

Multiplex-PCR-ELISA-System zum Nachweis von parodontopathogenen Bakterien

Multiplex-PCR-ELISA-System for the detection of periodontitis causing bacteria

in vitro Diagnosticum



OdontoPlex™ bulk (96 Tests)	REF: 3990
OdontoPlex™ bulk (480 Tests)	REF: 3991
gültig ab / valid from: März 2008 / March 2008	














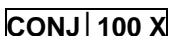

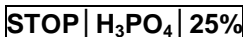



Inhaltsverzeichnis

Seite

OdontoPlex™

OdontoPlex™	1
1. Einleitung	4
2. Bakterien und Parodontitis	4
3. Aufbau des OdontoPlex™ - Testsystems	5
4. Testprinzip	6
5. Reagenzien	7
6. Warn- und Entsorgungshinweise	8
7. Hinweise zur Handhabung	8
8. Probenmaterial	9
9. Testdurchführung	9
10. Kurzanleitung der Testdurchführung	12
11. Auswertung	12
12. Hinweise zur Interpretation der Testergebnisse	13
13. Kontrollergebnisse des OdontoPlex™-Testsystems	13
14. Troubleshooting	14
15. Leistungsdaten	14
16. Literatur / References	29

Erläuterungen der Symbole auf den Etiketten / Explanation of symbols used in labeling

	Deutsch	Englisch
	In vitro Diagnostikum	For in vitro diagnostic use
	Lot-Nummer	Batch code
	Bestell-Nummer	Catalogue number
	Verwendbar bis	Use by
	Lagertemperatur	Temperature limitation
	PCR-Primer-Mix	PCR primer mixture
	Nukleotid-Mix	Nucleotide mixture
	PCR-Negativkontrolle	PCR negative control
	Mikrotiterstreifen, abbrechbar	Micro well strip, breakable
	Reagenzienkontroll-Mikrotiterstreifen, abbrechbar	Reagent control microwell strip, breakable
	Hybridisierungspuffer	Hybridization buffer
	Stringente Waschlösung	Stringent washing solution
	Waschpuffer, 20x konzentriert	Washing buffer, 20x concentrated
	Konjugat, 100x konzentriert	Conjugate, 100x concentrated
	TMB-Substrat	TMB substrate
	Stopplösung	Stop solution
	Inhalt, enthält	Contains
	Gebrauchsinformation beachten	Consult instructions for use
 R 34 S 26 / S 45	Ätzend	Corrosive

¹ Definition der Parameter siehe Tabelle S. 6 / definition of parameters see table p. 19

Hinweis auf besondere Gefahren und Sicherheitsratschläge (R- und S-Sätze)

Nature of special risk and safety precautions (R- and S-codes)

R 34 Verursacht Verätzungen / *Causes burns*

S 26 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren / *In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice*

S 45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen) / *In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible)*

OdontoPlex™

Multiplex-PCR-ELISA-System zum Nachweis von parodontopathogenen Bakterien

in vitro Diagnostikum

1. Einleitung

Das **OdontoPlex™** - Testsystem ist ein qualitatives *in vitro* Diagnostikum zum gemeinsamen molekulargenetischen Nachweis der sieben parodontopathogenen Bakterienspezies *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Micromonas micros*, *Treponema denticola* und *Fusobacterium nucleatum*.

2. Bakterien und Parodontitis

Hintergrund:

Die Parodontitis (im Volksmund meist als Parodontose bezeichnet) ist eine Erkrankung, die unbehandelt zum Verlust von Zähnen führen kann. Darüber hinaus kann sie erhebliche Auswirkungen auf die Gesamtgesundheit haben. Erkrankungen des Herzens und anderer innerer Organe und ein um siebenfach erhöhtes Risiko von Frühgeburten durch Parodontitis-Bakterien sind entsprechende Beispiele. Leider werden aber die Gefahren der Parodontitis immer noch erheblich unterschätzt. Dabei handelt es sich um eine Krankheit, die - rechtzeitig erkannt - heilbar ist bzw. durch rechtzeitige präventive Maßnahmen absolut vermeidbar ist. Für die Auswahl einer individuell abgestimmten Therapie ist dabei die Kenntnis der Faktoren von maßgeblicher Wichtigkeit, die für die Entstehung und den Verlauf der Erkrankung verantwortlich sind. Auch die Erbanlagen spielen nach neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen hierbei eine bedeutende Rolle. Neu entwickelte Testsysteme sind in der Lage, dem Zahnarzt diese wichtigen Informationen zu liefern und damit frühzeitig den Weg für die richtige Prophylaxe bzw. Therapie zu bereiten.

Bakterien und Erbanlagen sind für Entstehung und Verlauf einer Parodontitis verantwortlich

Für Entstehung, Ausmaß und Verlauf der Parodontitis sind verschiedene Faktoren verantwortlich. Aus diesem Grund können auch Erscheinungs- und Entwicklungsform der Parodontitis individuell unterschiedlich ausfallen. Um eine auf den einzelnen Patienten abge-

stimmte, erfolgsversprechende Therapie zu ermöglichen, ist es daher wichtig zu wissen, welche Faktoren bei dem jeweiligen Patienten als Ursache der Erkrankung ausgemacht werden können. So kann zum Beispiel das Vorhandensein bestimmter Bakterienarten eine Antibiotikatherapie notwendig machen. Ob und welches Antibiotikum in welcher Menge für die Therapie eingesetzt wird, hängt dabei entscheidend von Art und Anzahl der vorhandenen Keime ab. Insbesondere die sieben Markerbakterien *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Micromonas micros*, *Fusobacterium nucleatum* und *Treponema denticola* sind ursächlich mit der Entstehung und Fortschreiten der Parodontitis assoziiert, indem sie Stoffe produzieren und induzieren, die letztendlich über eine Entzündungsreaktion zu einem massiven Attachment- und Knochenverlust führen.

Bakterienarten wie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* haben zudem die Fähigkeit, sich im Weichgewebe zu verschanzen und sich dadurch dem instrumentellen Zugriff gänzlich zu entziehen. Liegen diese Arten vor, wird eine konventionelle, also mechanische Parodontitis-Behandlung, mittelfristig ohne Erfolg bleiben, da es in der Regel schnell zu einer erneuten Bakterienbesiedlung kommt, mit der die Beschwerden für den Patienten möglicherweise noch zunehmen. Hier kann häufig nur mit einer gezielten Antibiotika-Begleittherapie behandelt werden. Wichtig ist in diesem Zusammenhang die Wahl des richtigen und optimal wirkenden Antibiotikums, um einen nachhaltigen Behandlungserfolg zu erzielen. Hierzu ist eine vorhergehende Diagnose mittels eines PCR-DNA-Sondentests unabdingbar.

3. Aufbau des OdontoPlex™ - Testsystems

OdontoPlex™ PAF PCR-Reagenzien:

Herstellung spezifischer PCR-Amplifikate aus Probenmaterial, ausreichend für maximal zehn Hybridisierungen pro PCR-Reaktion.

Verwendbare Hybridisierungsmodule: ***Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*** und ***Fusobacterium nucleatum***

OdontoPlex™ PMT PCR-Reagenzien:

Herstellung spezifischer PCR-Amplifikate aus Probenmaterial, ausreichend für maximal zehn Hybridisierungen pro PCR-Reaktion.

Verwendbare Hybridisierungsmodule: ***Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Micromonas micros*, *Treponema denticola*** und **interne Kontrolle**

OdontoPlex™ Hybridisierungsmodule:

Einzelkavitäten mit immobilisierten Oligonukleotidsonden zum spezifischen Nachweis der relevanten Spezies (VE 96 Stück pro Sonde) und Reagenzien zur Durchführung von 96 reversen Hybridisierungen

In der folgenden Tabelle sind die im **OdontoPlex™** Testsystem enthaltenen spezifischen Sonden (Hybridisierungsmodule) aufgeführt.

Hybridisierungsmodule des **OdontoPlex™** Testsystem

Symbole	Spezifität	Kavitätenfarbe
MTS BR AA	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	rot
MTS BR PG	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	blau
MTS BR FN	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	gelb
MTS BR TF	<i>Tannerella forsythia</i>	orange
MTS BR MM	<i>Micromonas micros</i>	schwarz
MTS BR TD	<i>Treponema denticola</i>	violett
MTS BR PI	<i>Prevotella intermedia</i>	grün
MTS BR IC	Interne Kontrolle	weiß

4. Testprinzip

OdontoPlex™ PCR-Reagenzien enthalten markierte Oligonukleotidprimer, die die simultane, spezifische Amplifikation verschiedener DNS-Bereiche in einer einzigen PCR-Reaktion ermöglichen.

In Anwesenheit von relevanter DNS werden spezifische Amplifikate der verschiedenen Bakterienspezies gebildet, die folgend mit den verschiedenen Hybridisierungsmodulen visualisiert werden.

Dazu werden die Amplifikate aus den beiden (**PAF** bzw. **PMT**) PCRs hitzedenaturiert und zu einzelsträngigen, spezifischen Sonden gegeben, die an der Polystyroloberfläche von Mikrotiterplatten immobilisiert sind. Unter Verwendung eines Hybridisierungspuffers findet eine Hybridisierung komplementärer Sequenzen statt, die nachfolgend mittels ELISA-Prinzip detektiert werden kann. Dazu wird nach mehreren stringenten Waschschritten ein Peroxidase(POD)-Konjugat zugegeben. Dieses bindet hochspezifisch an die Markierung des an die Oligonukleotidsonde gebundenen Einzelstrangs des PCR-Produkts. Nach neuerlichen Waschschritten wird TMB-Substratlösung zugesetzt, die nach Umsetzung durch die POD eine blaue Farbe erzeugt. Diese Reaktion wird mit Hilfe einer Stopplösung beendet. Dabei ist ein Farbumschlag nach Gelb zu beobachten. Die Extinktion der verschiedenen Kavitäten wird nun in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Positive Signale zeigen die spezifische Amplifikation bestimmter DNS-Bereiche während der **OdontoPlex™** PCR an und damit das Vorhandensein der entsprechenden Bakterienspezies in der zu untersuchenden Probe.

5. Reagenzien

5.1 Packungsinhalt des PCR-Moduls:

Die Reagenzien einer Packung reichen für **96 (REF 3990)** bzw. **480 (REF 3991)** Bestimmungen.

Jeder Reagensatz enthält:

PRIMER PAF	Primer-Mix für PAF-PCR (Grüne Verschlusskappe, gebrauchsfertig) Enthält markierte Oligonukleotidprimer	120 µl / 600 µl
PRIMER PMT	Primer-Mix für PMT-PCR (Violette Verschlusskappe, gebrauchsfertig) Enthält markierte Oligonukleotidprimer	120 µl / 600 µl
dNTP	Nukleotid-Mix (Gelbe Verschlusskappe, gebrauchsfertig) enthält dATP, dCTP, dGTP, dTTP	240 µl / 1200 µl
CONTROL -	Negativkontrolle (Blaue Verschlusskappe, gebrauchsfertig)	100 µl / 500 µl
MTS BR BLANK	Reagenzienkontrolle, abbrechbar	16 / 48 Kavitäten

5.2 Packungsinhalt der Hybridisierungs-Module:

Die Reagenzien einer Packung reichen für **96 (REF 3990)** bzw. **480 (REF 3991)** Bestimmungen.

Jeder Reagensatz enthält:

MTS BR XX	Farbcodierte Mikrotiterstreifen mit spezifischer Oligonukleotid-Sonde, abbrechbar	96 Kavitäten / 5 x 96 Kavitäten
HYBBUF	Hybridisierungslösung (gebrauchsfertig) Enthält Standard-Saline-Citrat-Puffer (SSC), Natriumdodecylsulfat (SDS) und N-Lauryl-Sarkosin	60 ml / 300 ml
STRGWASH	Stringente Waschlösung (gebrauchsfertig) Enthält SSC und SDS	500 ml / 2500 ml
WASHBUF 20 X	Waschpuffer (20x konzentriert) Enthält Phosphat-Puffer, NaCl u. Detergens, Konservierungsstoffe: Methylisothiazolon u. Oxypyryon	100 ml / 500 ml
CONJ 100 X	Konjugat (100x konzentriert , transparente Verschlusskappe) Konservierungsstoffe: Methylisothiazolon, Dimethylaminoantipyrene u. Chloracetamid	1 ml / 5 ml
SUBS TMB	TMB(Tetramethylbenzidin)-Substratlösung (gebrauchsfertig)	100 ml / 500 ml
STOP H₃PO₄ 25%	Stopplösung (25 %ige Phosphorsäure, gebrauchsfertig)	100 ml / 500 ml
	hyplex [®] Lysepuffer	60 ml / 300 ml

5.3 Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

Reagenzien

- **hitze stabile Tth - DNA Polymerase (Best. Nr. 3954)**
- PCR-Reaktionspuffer
- steriles H₂O_{dd} (Aqua bidest)

Zubehör

- Thermoblock
- PCR-Thermocycler
- PCR-Reaktionsgefäße (empfohlen: 0,2 ml)
- Pipetten mit sterilen Einmalspitzen: variable Pipetten 0,2 - 2 µl, 2 - 20 µl und 20 - 200 µl
- Inkubationsschrank (50°C ± 1°C)
- Mikrotiterplatten-Photometer für Extinktionsmessung bei 450 nm und 620 nm

6. Warn- und Entsorgungshinweise

- ☞ Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben in Kontakt kommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder autoklaviert werden.
- ☞ Während des gesamten Testablaufs müssen geeignete Einmal-Handschuhe getragen werden.
- ☞ Das Konjugat, die TMB-Substratlösung und der Waschpuffer enthalten Konservierungsstoffe. Eine Berührung mit Haut oder Schleimhäuten ist zu vermeiden. Sollte es dennoch dazu kommen, betroffene Stellen mit reichlich Wasser spülen.
- ☞ Phosphorsäure ist reizend. Kontakt mit Haut und Schleimhäuten unbedingt vermeiden. Sollte es dennoch dazu kommen, betroffene Stellen mit reichlich Wasser spülen.

7. Hinweise zur Handhabung

Die Reagenzien des **OdontoPlex™** PCR-Moduls sollten nach Erhalt bei - 20°C gelagert werden. Häufiges Auftauen und Einfrieren der Reagenzien ist zu vermeiden. Nach erstmaligem Gebrauch ist eine Lagerung bei 2...8°C zur Vermeidung von Auftau- und Einfriereschritten möglich, die Reagenzien sollten dann aber innerhalb von 3 Monaten aufgebraucht werden.

Die Reagenzien der **OdontoPlex™** Hybridisierungsmodule sollten bei 2...8°C gelagert werden.

Vor Testbeginn sind Waschpuffer, TMB-Substratlösung, Stopplösung sowie die verschlossene Druckverschlußbeutel mit den darin enthaltenen Mikrotiterplatten für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur (18...25°C) zu temperieren. Die stringente Waschlösung muss auf 50°C vorgewärmt werden. Hybridisierungspuffer und Konjugat stets kühl halten.

Die Packungen tragen ein Verfalldatum, nach dessen Erreichen keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden kann.

Um die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Produktbildung zu minimieren, empfiehlt es sich, die Amplifizierungsreaktionen auf Eis zu pipettieren und die DNA-Polymerase als letztes Reagenz hinzuzufügen. Während der gesamten Testvorbereitung sollten zwecks Kontaminationsgefahr geeignete (ungepuderte) Einmal-Handschuhe getragen und Pipettenspitzen mit Filtereinsatz verwendet werden.

8. Probenmaterial

Das Probenmaterial kann aus extrahierter DNS, reinen Bakterienzellen oder potentiell infiziertem Patientenmaterial bestehen.

Sollen mit diesem System direkt Sulcusabstriche getestet werden, so sind pro Endodontie-Papierspitze 100 µl **hyplex® Lyse-Puffer** in das Probentransportgefäß zu geben. Der Lyse-Puffer wird für 10 Min im Thermoblock (99° C) inkubiert. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (60 sec. bei 10.000 x g) werden jeweils 5 µl des Überstandes in die beiden Amplifizierungsreaktionen eingesetzt.

9. Testdurchführung

9.1 Vorbereitung der Amplifizierungsreaktion

Die Reaktionen werden unter Verwendung des mitgelieferten PCR - Puffer nach folgendem Ansatz vorbereitet:

PAF-PCR:

5 µl	Probenmaterial (bzw. 5 µl Negativkontrolle)
1 µl	Nukleotid-Mix (Gelbe Verschlusskappe)
1 µl	PAF-Primer-Mix (Grüne Verschlusskappe)
5 µl	10x PCR-Puffer
0,2 µl	Tth - DNA Polymerase (1 U)
ad 50 µl	H ₂ O _{dd}

und

PMT-PCR:

5 µl	Probenmaterial (bzw. 5 µl Negativkontrolle)
1 µl	Nukleotid-Mix (Gelbe Verschlusskappe)
1 µl	PMT-Primer-Mix (Violette Verschlusskappe)
5 µl	10x PCR-Puffer
0,4 µl	Tth - DNA Polymerase (2 U)
ad 50 µl	H ₂ O _{dd}

Achtung! Zuviel Zellmaterial kann die Effizienz einer PCR beträchtlich verringern und zu falsch negativen Resultaten führen!

9.2 Durchführung der Amplifizierungsreaktion

Programmierung des PCR-Thermocyclers mit folgendem Programm:

Zyklus	Temperatur [°C]	Zeit	Reaktion
1x	94	5 Min	Anfangsdenaturierung der DNS
35x	94	25 Sek	Denaturierung der DNS
	60	25 Sek	Bindung der Primer
	72	20 Sek + 1 Sek/Zyklus oder 45 Sek	3'-OH Elongation der Primer
1x	72	3 Min	Finale Elongation

Das Reaktionsgemisch sollte nach Beendigung der PCR bis zur Durchführung der reversen Hybridisierung bei 2...8°C gelagert werden.

9.3 Durchführung der reversen Hybridisierung

Zur Durchführung der reversen Hybridisierung werden die acht verschiedenen **Odon-toPlex™** Sonden-Module benötigt. Die unten genannten Mengenangaben beziehen sich jeweils auf die Bearbeitung einer **einzelnen** Mikrotiterplattenkavität.

Beispiele: Fünf Proben sollen auf Anwesenheit von parodontopathogenen Bakterien getestet werden. Dazu werden für die Proben jeweils 5 Sonden **AA, PG, FN** (für die PAF-PCR) und **TF, PI, TD, MM und IC** (für die PMT-PCR) und jeweils 1 Sondenkavität für die jeweilige Negativkontrolle benötigt. Außerdem wird 1 Reagenzienkontrollkavität benötigt. Die Mengenangaben müssen also mit dem Faktor 49 (5+5+5+5+5+5+5+5+8+1) multipliziert werden.

Vor Gebrauch müssen die Stringente Waschlösung auf 50°C vorgewärmt bzw. Waschpuffer, TMB-Substratlösung, Stopplösung und die benötigten Mikrotiterplatten auf Raumtemperatur (18...25°C) gebracht werden.

9.3.1 Testplattenzusammenstellung

Die Kavitäten werden fest in den Rahmen gesteckt. Die nicht benötigten Kavitäten werden wieder im Druckverschlussbeutel zusammen mit dem Trockenmittel bei 2...8°C gelagert. Für jeden Testansatz muss eine der im hyplex Hybridisierungs-Modul enthaltenen Reagenzienkontrollen zur Ermittlung des Reagenzienhintergrundsignals mit verwendet werden. Sie werden nach anfänglicher Zugabe von 50 µl Hybridisierungspuffer in gleicher Weise wie die Proben prozessiert. Zusätzlich muss für jeden Testansatz eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Der PCR-Ansatz der Negativkontrolle wird entsprechend Punkt 9.3.2 verdünnt und je 50 µl der entstandenen Lösung in die verwendeten spezifischen Sondenkavitäten pipettiert und laut Protokoll (siehe unten) weiter behandelt.

9.3.2 Vorbereitung der PCR-Probe und Durchführung der Hybridisierung

Die Reaktions-Mixe der beiden durchgeführten **Odon-toPlex™** PCRs werden im Reaktionsgefäß für 10 Min. bei 95°C denaturiert. Es wird die Durchführung in einem Thermocycler mit Deckelheizung empfohlen.

Es wird umgehend der jeweilige gesamte PCR-Ansatz (50 µl) zu **300 µl** kühler (2...8°C) Hybridisierungslösung gegeben, gut gemischt und davon jeweils **50 µl** rasch in die entsprechenden Kavitäten pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird **30 Min.** bei **50°C** inkubiert. Zur

Vermeidung eines hohen Verdunstungsverlusts an Hybridisierungslösung sollte die Mikrotiterplatte abgedeckt werden.

9.3.3 Stringentes Waschen

Die Kavitäten werden vollständig geleert und **dreimal kurz** mit je **200 µl** der vorgewärmten Stringenten Waschlösung gewaschen.

Es ist darauf zu achten, dass die Stringente Waschlösung zwischen den Waschsritten vollständig entfernt wird. Nach Beenden des letzten Waschsrittes Platte auf einem Papiertuch ausschlagen, um letzte Flüssigkeitsreste aus den Kavitäten zu entfernen.

9.3.4 Herstellung des Waschpuffers

Das Waschpufferkonzentrat wird **1+19** mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ verdünnt. Pro Kavität werden 0,05 ml Konzentrat und 0,95 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ gemischt. Der Waschpuffer kann auch in größerer Menge hergestellt und für eine spätere Verwendung eine Woche bei Raumtemperatur gelagert werden.

9.3.5 Waschen

Die Kavitäten werden einmal kurz bei **Raumtemperatur** mit **200 µl** Waschpuffer gewaschen.

9.3.6 Inkubation mit Peroxidase-Konjugat

Die Konjugatlösung muss stets frisch zubereitet werden.

Pro Kavität werden 1 µl Konjugat-Konzentrat (Durchsichtige Verschlusskappe) mit 100 µl Waschpuffer in einem sauberen Gefäß versetzt und gut gemischt (Verdünnung **1+100**). Es werden **100 µl** pro Kavität zupipettiert und die Mikrotiterplatte für **30 Min.** bei **Raumtemperatur** inkubiert.

9.3.7 Waschen

Die Kavitäten werden geleert und **dreimal** kurz mit je **200 µl** Waschpuffer bei **Raumtemperatur** gewaschen. Es ist darauf zu achten, dass die Waschlösung zwischen den Waschsritten vollständig entfernt wird.

9.3.8 Substratreaktion

Die TMB-Substratlösung ist gebrauchsfertig. Es werden **100 µl** pro Kavität pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird **30 Min** bei **37°C** unter Schutz vor direkter Sonneneinstrahlung inkubiert. Die Zeit wird ab Pipettieren der ersten Kavität gerechnet.

9.3.9 Abstoppen der Reaktion

Zum Abstoppen der Reaktion werden **100 µl** Stopplösung pro Kavität zupipettiert. Dabei ist dasselbe Pipettierschema wie beim Pipettieren der TMB-Substratlösung einzuhalten.

9.3.10 Messung der Extinktion

Die Extinktion der einzelnen Kavitäten wird in einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm und einer Referenzlänge von 620 - 650 nm gemessen. Der Nullabgleich erfolgt gegen Luft. Die Messung sollte innerhalb von 60 Minuten nach Abstoppen der Reaktion erfolgen.

10. Kurzanleitung der Testdurchführung

Verdünnungen:

- Waschpufferverdünnung 1+19 mit H₂O deion. 0,05 ml + 0,95 ml pro Kavität
- Konjugatverdünnung 1+100 mit verdünntem Waschpuffer 1 µl + 100 µl pro Kavität

Testschritte:

- Denaturierung PCR-Reaktionsansatz 10 Min. bei 95°C
- Probenverdünnung: PCR-Reaktionsansatz zu 300 µl
Hybridisierungslösung geben
- Hybridisierung: 50 µl pro Kavität 30 Min. bei 50°C ± 1°C
- Stringentes Waschen: 200 µl pro Kavität 3 x kurz
- Waschschrift: 200 µl pro Kavität 1 x kurz
- Konjugatinkubation: 100 µl pro Kavität 30 Min. bei Raumtemperatur
- Waschschrift: 200 µl pro Kavität 3 x kurz
- Substratinkubation: 100 µl pro Kavität 30 Min. bei 37°C
- Abstoppen: 100 µl pro Kavität mit Stopplösung
- Photometrieren 450 / 620 nm

11. Auswertung

Der Test ist unter folgenden Bedingungen auswertbar:

- Extinktion Reagenzienkontrolle $\leq 0,100$
- Extinktion Negativkontrolle (NK) $\leq 0,150$

Bewertung der Extinktion der internen Kontrolle:

Extinktion der IK $\leq 0,100$

Probe inhibiert (oder steril) → nicht auswertbar → neue Probe notwendig;

Extinktion der IK $\leq 0,500$

Probe prinzipiell auswertbar, aber schlechte Probennahme (wenig bakterielles Zellmaterial in der Probe) oder Patient frisch therapiert;

Extinktion der IK $\geq 0,500$

Probe auswertbar

Auswerteschema bei direkter Verwendung von Patientenmaterial oder daraus isolierter DNS:

Auswertekriterien für PAF-PCR:

	AA	PG	FN
+	> 0,300	> 0,300	> 0,300
++	> 1,0	> 1,0	> 1,5
+++	> 2,0	> 2,0	> 2,5

Auswertekriterien für PMT-PCR:

	PI	TF	MM	TD
+	> 0,2	> 0,2	> 0,15	> 0,2
++	> 0,4	> 0,4	> 0,3	> 0,5
+++	> 0,6	> 0,6	> 0,5	> 1,0

12. Hinweise zur Interpretation der Testergebnisse

Mit dem **OdontoPlex™** -System liegt ein schneller, universell einsetzbarer molekularbiologischer Test für den Nachweis von parodontopathogenen Bakterien in Sulcusproben vor. Positive Ergebnisse des **OdontoPlex™** -Systems weisen das Vorhandensein von parodontopathogenen Bakterien in einer Probe nach.

Das Ergebnis des **OdontoPlex™** -Systems ist abhängig von der Quantität und Qualität der in der Probe befindlichen DNS.

Ein negatives **OdontoPlex™** -Testresultat kann die Präsenz von parodontopathogenen Bakterien im Probenmaterial nicht vollständig ausschließen.

Zudem kann die Effizienz der PCR z.B. durch inhibitorische Stoffe im Probenmaterial drastisch reduziert werden, was wiederum geringe Signale zur Folge haben kann.

„Inhibierte“ Proben sollten gemäß Kap. 11 bewertet werden, da die Möglichkeit einer fehlerhaften Probennahme besteht.

13. Kontrollergebnisse des OdontoPlex™ - Testsystems

In der Negativkontrolle sollte kein Amplifikationsprodukt und somit kein Hybridisierungssignal mit irgendeiner Sonde zu beobachten sein.

14. Troubleshooting

Durchweg schwache oder gar keine Signale

- Temperatur der Stringenten Waschlösung deutlich über 50°C
- PCR-Produkte vor Hybridisierung nicht (ausreichend) denaturiert bzw. wieder renaturieren lassen
- Substrat nicht auf Raumtemperatur äquilibriert
- Falsche Mengen an Konjugat und/oder Substrat eingesetzt
- Bei Verwendung des hyplex[®] Lysepuffers ungenügende thermische Lyse (zu kurz; Temperatur nicht 99°C)

Allgemein hohe (Hintergrund)-Signale

- Die Verwendung von nicht ausreichend erwärmter Stringenter Waschlösung bzw. zu niedrige Temperatur des Inkubators kann zu unspezifischen Signalen führen. Spezifische, positive Signale werden im gleichen Maße verstärkt, so dass der Kontrast zwischen unspezifischen und spezifischen Signalen erhalten bleibt. Bei Zweifel an der Auswertbarkeit des Testlaufs (siehe 11) wird eine Wiederholung unter Verwendung der korrekten Durchführungsparameter empfohlen.

15. Leistungsdaten

15.1 Klinische Evaluierung:

a) OdontoPlex[™] PAF-PCR

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Anzahl PCR	OdontoPlex [™] PCR		
Kultur	neg.	pos.	Gesamtergebnis
neg.	59	15	74
pos.	0	17	17
Gesamtergebnis	59	32	91

Porphyromonas gingivalis

Anzahl PCR	OdontoPlex [™] PCR			
Kultur	grzw.	neg.	pos.	Gesamtergebnis
neg.	0	46	1	47
pos.	1	2	41	44
Gesamtergebnis	1	48	42	91

Fusobacterium nucleatum

Anzahl PCR	OdontoPlex™ PCR		
Kultur	neg.	pos.	Gesamtergebnis
pos.	0	91	91
neg.	0	0	0
Gesamtergebnis		91	91

Auswertung OdontoPlex™ PAF-PCR

Für die drei getesteten Nachweise lagen die **Sensitivitäten** für *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Fusobacterium nucleatum* bei 100 %, 95 % bzw. 100 %.

Die **Spezifitäten** lagen für *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* bei 79 % bzw. 98 %; für *Fusobacterium nucleatum* standen keine negativen Proben zur Verfügung.

b) OdontoPlex™ PMT-PCR*Treponema denticola*

Anzahl PCR	OdontoPlex™ PCR		
MicroIDent-PCR	neg.	pos.	Gesamtergebnis
neg.	2	0	2
pos.	0	8	8
Gesamtergebnis	2	8	10

Micromonas micros

Anzahl PCR	OdontoPlex™ PCR		
Bakteriologie	neg.	pos.	Gesamtergebnis
neg.	11	0	11
pos.	14	51	65
Gesamtergebnis	25	51	76

Prevotella intermedia

Anzahl PCR	OdontoPlex™ PCR		
Bakteriologie	neg.	pos.	Gesamtergebnis
neg.	33	5	38
pos.	4	34	38
Gesamtergebnis	37	39	76

Tannerella forsythia

Anzahl PCR	OdontoPlex™ PCR		
Bakteriologie	neg.	pos.	Gesamtergebnis
neg.	5	3	8
pos.	4	64	68
Gesamtergebnis	9	67	76

Auswertung OdontoPlex™ PMT-PCR

Für die vier getesteten Nachweise lagen die **Sensitivitäten** für *Treponema denticola*, *Micromonas micros*, *Prevotella intermedia* und *Tannerella forsythensis* bei 100 %, 78 %, 90 % bzw. 94 %.

Die **Spezifitäten** lagen für die vier Erreger bei 100 %, 100 %, 87 % bzw. 63 % (nur 8 negative Proben).

Instructions for use

OdontoPlex™

Multiplex-PCR-ELISA-System for the detection of periodontitis causing bacteria

in vitro diagnosticum

1. Introduction

The **OdontoPlex™** test system is a qualitative *in vitro* diagnostic agent for the combined molecular genetic detection of the seven periodontal pathogenic bacterial species: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Micromonas micros*, *Treponema denticola* and *Fusobacterium nucleatum*.

2. Bacteria and periodontitis

Background:

Periodontitis is a disease which can lead to the loss of teeth, if left untreated. It can also have a major effect on patients' general health. Examples of the effects of periodontitis bacteria include cardiac diseases, diseases of other internal organs and a seven fold increased risk of premature births. Unfortunately, however, the dangers of periodontitis are still considerably underestimated. And yet this disease - if diagnosed in good time - can be cured or completely prevented, if preventive measures are taken in good time. Knowledge of the factors responsible for the onset and course of the disease are of crucial importance here in selecting an individually tailored therapy. According to the latest scientific findings, genetic factors also play an important role. Newly developed test systems are able to supply the dentist with this vital information, thus paving the way at an early stage for the right prophylaxis or therapy.

Bacteria and genetic factors are responsible for the onset and course of periodontitis

Various factors are responsible for the onset, extent and course of periodontitis. That is why the course and development of periodontitis can vary from individual to individual. In order to provide a promising therapy tailored to the individual patient, it is therefore important to be able to identify the factors causing the disease in the respective patient. For example, the presence of certain types of bacteria may necessitate an antibiotic therapy. The decision whether to use an antibiotic as a therapy, and if so which antibiotic and at what dosage, depends crucially on the type and quantity of the bacteria present. In particular, the seven marker bacteria: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Micromonas micros*, *Fusobacterium nucleatum* and *Treponema denticola* are causally linked with the onset and progress of periodontitis, in that they produce and induce substances which ultimately lead to massive attachment and bone loss as a result of an inflammatory reaction.

Moreover, species of bacteria, such as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*, have the ability to entrench themselves in the soft tissue, thereby completely evading access by instruments. Where these types of bacteria are present, a conventional, i.e. a mechanical, treatment of periodontitis is unsuccessful in the medium term, since a new bacterial colony is generally quickly established, which may possibly aggravate the patient's condition still further. Often, the only therapy option in these cases is a targeted concomitant antiobiotic therapy. It is important in this connection to select the correct and optimally effective antiobiotic in order to achieve sustained treatment success. Diagnosis before therapy using a PCR-DNA probe test is indispensable in achieving that goal.

3. Structure of the OdontoPlex™ test system

OdontoPlex™ PAF PCR reagents:

Manufacture of specific PCR amplification products from sample material, sufficient for a maximum of ten hybridisations per PCR reaction.

Suitable hybridisation modules: ***Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Fusobacterium nucleatum***

OdontoPlex™ PMT PCR reagents:

Manufacture of specific PCR amplification products from sample material, sufficient for a maximum of ten hybridisations per PCR reaction.

Suitable hybridisation modules: ***Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Micromonas micros*, *Treponema denticola* and internal control.**

OdontoPlex™ hybridisation modules:

Single wells with immobilised oligonucleotide probes for the specific detection of the relevant species (sales unit 96 wells per probe) and reagents to conduct 96 reverse hybridisations.

The following table lists the specific probes (Hyb-modules) available separately for the **OdontoPlex™** test system.

Hyb-modules for the **OdontoPlex™** test system

Symbols	Specificity	Well colour
MTS BR AA	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	red
MTS BR PG	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	blue
MTS BR FN	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	yellow
MTS BR TF	<i>Tannerella forsythia</i>	orange
MTS BR MM	<i>Micromonas micros</i>	black
MTS BR TD	<i>Treponema denticola</i>	purple
MTS BR PI	<i>Prevotella intermedia</i>	green
MTS BR IC	Interne Kontrolle	white

4. Principle of the test

OdontoPlex™ PCR reagents contain labelled oligonucleotide primers which allow the simultaneous, specific amplification of different DNA sequences in a single PCR reaction. Specific amplification products of the different bacterial species are formed in the presence of the relevant DNA which are subsequently visualised with the different hybridisation modules.

For this purpose, the amplification products from both (**PAF** or **PMT**) PCRs are heat-denatured and added to single strand specific probes which are immobilised on the polystyrene surface of microtiter plates. A hybridisation buffer is used and a hybridisation of complementary sequences occurs which can subsequently be detected by means of the ELISA principle. For this purpose, a peroxidase (POD) conjugate is added after several stringent wash steps. This binds highly specifically to the labelling on the single strand of the PCR product bound to the oligonucleotide probe. After further wash steps, TMB substrate solution is added, which produces a blue colour after conversion by POD. This reaction is stopped by means of a stop solution. A change of colour to yellow is to be observed when this occurs. Extinction of the various wells is then measured in a photometer at a wave length of 450 nm.

Positive signals indicate the specific amplification of certain DNA sequences during the **OdontoPlex™** PCR and thus the presence of the corresponding bacterial species in the sample to be examined.

5. Reagents

5.1 Contents of PCR modules:

The reagents contained in one kit are sufficient for **96 (REF 3990)** respectively **480 (REF 3991)** determinations.

Each reagent set contains:

PRIMER PAF	Primer Mix for PAF PCR (green cap, ready for use) Contains labelled oligonucleotide primer	120 µl / 600 µl
PRIMER PMT	Primer Mix for PMT PCR (violet cap, ready for use) Contains labelled oligonucleotide primer	120 µl / 600 µl
dNTP	Nucleotide Mix (yellow cap, ready for use) Contains dATP, dCTP, dGTP, dTTP	240 µl / 1200 µl
CONTROL -	Negative control (blue cap, ready for use)	100 µl / 500 µl
MTS BR BLANK	Reagent control, breakable	16 / 48 wells

5.2 Contents of Hyb-modules:

The reagents contained in one kit are sufficient for **96 (REF 3990)** respectively **480 (REF 3991)** determinations.

Each reagent set contains:

MTS BR XX	Colour-coded wells with specific oligonucleotide probe, breakable	96 wells / 5 x 96 wells
HYBBUF	Hybridisation buffer (ready for use) Contains standard saline citrate buffer (SSC), sodium dodecyl sulphate (SDS) and N-lauroylsarcosine	60 ml / 300 ml
STRGWASH	Stringent washing solution (ready for use) Contains SSC and SDS	500 ml / 2500 ml
WASHBUF 20 X	Washing buffer (concentrated 20 times) Contains phosphate buffer, NaCl and detergent, preservatives: methylisothiazolone and oxypyron	100 ml / 500 ml
CONJ 100 X	Conjugate (concentrated 100 times , transparent cap) Preservatives: methylisothiazolone, dimethylaminoantipyrene and chloracetamide	1 ml / 5 ml
SUBS TMB	TMB (tetramethylbenzidine) substrate solution (ready for use)	100 ml / 500 ml
STOP H₃PO₄ 25%	Stop solution (25 % phosphoric acid, ready for use)	100 ml / 500 ml
	hyplex [®] Lysis buffer	60 ml / 300 ml

5.3 Additional reagents and accessories required

Reagents

- **thermostable Tth - DNA polymerase (Cat. No. 3954)**
- PCR reaction buffer
- sterile, double-distilled H₂O

Accessories

- Heating block
- PCR thermocycler
- PCR reaction vessels (recommended: 0.2 ml)
- Pipettes with sterile disposable tips: variable pipettes 0.2 - 2 µl, 2 - 20 µl and 20 - 200 µl
- Incubator (50°C ± 1°C)
- Microtiter plate photometer for measuring extinction at 450 nm and 620 nm

6. Warnings and precautions

- ☞ All reagents and materials which come into contact with potentially infectious samples must be treated with suitable disinfectant or autoclaved.
- ☞ Suitable disposable gloves must be worn during the entire test.
- ☞ The conjugate, the TMB substrate solution and the washing buffer contain preservatives. Avoid contact with the skin or mucous membranes. If this does happen, rinse affected areas with plenty of water.
- ☞ Phosphoric acid is an irritating substance. Avoid contact with the skin and mucous membranes. If this does happen, rinse affected areas with plenty of water.

7. Handling notes

The reagents of the **OdontoPlex™** PCR module should be stored upon receipt at **- 20°C** . Frequent thawing and refreezing of the reagents are to be avoided. After being used for the first time, the reagents may be stored at 2...8°C to avoid thawing and refreezing steps, but in that case they should be used within three months.

The reagents of the **OdontoPlex™** hybridisation modules should be stored at **2...8°C** .

Before the test starts, the wash buffer, TMB substrate solution, stop solution as well as the closed snap-seal bag containing the microtiter plates are to be tempered to room temperature for at least 30 minutes (18...25°C). The stringent wash solution must be preheated to 50°C. The hybridisation buffer and conjugate should always be kept cool.

The packaging bears an expiry date. Quality cannot be guaranteed after this date has passed.

In order to minimise the possibility of nonspecific product formation, it is recommended that the amplification reactions be pipetted on ice and that the DNA polymerase be the last reagent to be added. Throughout the test preparation, suitable (unpowdered) disposable gloves should be worn and pipette tips with filter insert should be used because of the danger of contamination.

8. Sample material

The sample material may consist of extracted DNA, pure bacterial cells or potentially infected material obtained from patients.

If sulcus swabs are to be tested directly with this system, 100 µl **hyplex[®] lysis buffer** per endodontic paper point is to be added to the sample transport container.

The lysis buffer is incubated for 10 minutes in a heating block (99°C). After a short centrifugation step (60 seconds at 10,000 x g), 5 µl of the supernatant is added to each of the two amplification reactions.

9. Test procedure

9.1 Preparing the amplification reaction

The reactions are prepared using the buffer supplied by the DNA polymerase manufacturer and using the following batch:

PAF – PCR:

5 µl	Sample material (e.g. 5 µl negative control)
1 µl	Nucleotide mix (yellow cap)
1 µl	PAF - Primer mix (green cap)
5 µl	10x PCR buffer
0.2 µl	Tth - DNA polymerase (1 U)
to 50 µl	double-distilled H ₂ O

and

PMT – PCR:

5 µl	Sample material (e.g. 5 µl negative control)
1 µl	Nucleotide mix (yellow cap)
1 µl	PMT - Primer mix (violet cap)
5 µl	10x PCR buffer
0.4 µl	Tth - DNA polymerase (2 U)
to 50 µl	double-distilled H ₂ O

Caution! Too much DNA or cell material may considerably reduce the effectiveness of a PCR and lead to false negative results.

9.2 Amplification reaction

The PCR thermocycler should be programmed as follows:

Cycle	Temperature [°C]	Time	Reaction
Once	94	5 min	Initial denaturation of the DNA
35 times	94	25 sec	Denaturation of the DNA
	60	25 sec	Binding of the primers
	72	20 sec + 1 sec/cycle	3'-OH extension of the primers
		45 sec	
Once	72	3 min	Final extension

After completing the PCR, the reaction mixture should be stored at 2...8°C until reverse hybridisation is conducted.

9.3 Conducting the reverse hybridisation

The eight different **OdontoPlex™** probe modules are required for conducting the reverse hybridisation. The quantities stated below refer each time to the processing of an **individual** microtiter plate well.

Examples: Five samples are to be tested for the presence of periodontal pathogenic bacteria. To do this, five probes each, **AA, PG, FN** (for the PAF-PCR) and **TF, PI, TD, MM and IC** (for the PMT-PCR) are required for the samples and 1 special probe well is required for each respective negative control. 1 reagent control well is also required. The quantities must therefore be multiplied by the factor 49 (5+5+5+5+5+5+5+5+8+1).

Before use, the stringent wash solution is preheated to 50°C and the wash buffer, TMB substrate solution, stop solution and the required microtiter plates are tempered to room temperature (18...25°C).

9.3.1 Assembling the test plates

The wells are inserted firmly into the frame. Wells not required are stored in the snap-seal bag again with the desiccant at 2...8°C.

One of the reagent controls contained in the hyplex hybridisation module must be used for each test batch to determine the reagent background signal. They are processed in the same way as the samples, after the initial addition of 50 µl hybridisation buffer. In addition, there must be a negative control for each test batch.

The PCR batch of the negative control is diluted as in section 9.3.2 and 50 µl of the solution formed is pipetted into each of the specific probe wells used and further treated in accordance with the protocol (see below).

9.3.2 Preparation of the PCR sample and hybridisation procedure

The reaction mix of the two **OdontoPlex™** PCRs carried out is denatured in the reaction vessel for 10 minutes at 95°C. It is recommended that this procedure be carried out in a thermal cycler with a heated lid.

The respective entire PCR batch (50 µl) is immediately added to **300 µl** cool (2...8°C) hybridisation solution, mixed well and **50 µl** of this is quickly transferred by pipette into each

of the corresponding wells. The microtiter plate is incubated for **30 minutes** at **50°C**. The microtiter plate should be covered in order to avoid a high evaporative loss of hybridisation solution.

9.3.3 Stringent washing

The wells are completely emptied and each are washed **briefly three times** with **200 µl** of the preheated stringent wash solution.

Care must be taken to ensure that the stringent wash solution is completely removed between the wash steps. On completion of the last wash step, tap out the plate onto a paper cloth to remove the last remnants of fluid from the wells.

9.3.4 Manufacture of the wash buffer

The wash buffer concentrate is diluted **1+19** with deionised H₂O. 0.05 ml concentrate and 0.95 ml deionised H₂O are mixed per well. The wash buffer can also be manufactured in larger quantities and stored for later use at room temperature for up to one week.

9.3.5 Washing

The wells are washed once briefly at **room temperature** with **200 µl** wash buffer.

9.3.6 Incubation with peroxidase conjugate

The conjugate solution must be prepared afresh each time.

1 µl conjugate concentrate (transparent cap) and 100 µl wash buffer per well are mixed thoroughly (dilution **1+100**) in a clean vessel. **100 µl** is added to each well by pipette and the microtiter plate is incubated for **30 minutes** at **room temperature**.

9.3.7 Washing

The wells are emptied and each is washed briefly **three times** with **200 µl** wash buffer at **room temperature**, taking care to ensure that the wash solution is completely removed between the wash steps.

9.3.8 Substrate reaction

The TMB substrate solution is ready to use. Pipette **100 µl** per well. Incubate the microtiter plate for **30 minutes** at **37°C** away from direct sunlight. The time is calculated from pipetting of the first well.

9.3.9 Stopping the reaction

To stop the reaction, pipette **100 µl** of stop solution into each well, observing the same pipetting procedure as for pipetting of the TMB substrate solution.

9.3.10 Extinction measurement

Measure the extinction of the individual wells in a microtiter plate photometer at 450 nm and a reference length of 620 – 650 nm, with zero comparison being made against air. Measurement should be carried out within 60 minutes of stopping the reaction.

10. Brief instructions on test procedure

Dilutions:

- | | | |
|---------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| • Washing buffer dilution | 1+19 with deion. H ₂ O | 0.05 ml + 0.95 ml per well |
| • Conjugate dilution | 1+100 with diluted washing buffer | 1 µl + 100 µl per well |

Test steps:

- | | | |
|---------------------------|---|----------------------------|
| • Denaturation | PCR reaction batch | 10 min at 95°C |
| • Sample dilution: | Add PCR reaction batch to 300 µl hybridisation solution | |
| • Hybridisation: | 50 µl per well | 30 min at 50°C ± 1° C |
| • Stringent washing: | 200 µl per well | 3 times briefly |
| • Wash step: | 200 µl per well | Once briefly |
| • Conjugate incubation: | 100 µl per well | 30 min at room temperature |
| • Wash step: | 200 µl per well | 3 times briefly |
| • Substrate incubation: | 100 µl per well | 30 min at 37°C |
| • Stop: | 100 µl per well with stop solution | |
| • Photometric measurement | 450 / 620 nm | |

11. Evaluation

The test is to be evaluated under the following conditions:

- Extinction of reagent control ≤ 0.100
- Extinction of negative control (NCE) ≤ 0.150

Evaluation of the extinction of the internal control (IC):

Extinction of the IC ≤ 0.100

Sample inhibited (or sterile) → not evaluable → new sample required;

Extinction of the IC ≤ 0.500

Sample is in principle evaluable but poor sampling, (little bacterial cell material in the sample) or patient has just received therapy;

Extinction of the IC ≥ 0.500

Sample evaluable

Evaluation scheme for direct use of patient material or DNA isolated from patients:

Evaluation criteria for PAF-PCR:

	AA	PG	FN
+	> 0.300	> 0.300	> 0.300
++	> 1.0	> 1.0	> 1.5
+++	> 2.0	> 2.0	> 2.5

Evaluation criteria for PMT-PCR:

	PI	TF	MM	TD
+	> 0.2	> 0.2	> 0.15	> 0.2
++	> 0.4	> 0.4	> 0.3	> 0.5
+++	> 0.6	> 0.6	> 0.5	> 1.0

12. Interpretation of the test results

OdontoPlex™ System is a quick, universally usable molecular biological test for detecting periodontal pathogenic bacteria in sulcus samples.

Positive results from the **OdontoPlex™** System indicate the presence of periodontal pathogenic bacteria in a sample.

The results from the **OdontoPlex™** Systems depend on the quantity and quality of the DNA in the sample.

A negative **OdontoPlex™** test result cannot rule out the presence of periodontal pathogenic bacteria in the sample material.

In addition, the effectiveness of the PCR may be reduced drastically e.g. by inhibitory substances in the sample material which may in turn result in low signals.

“Inhibited” samples should be evaluated in accordance with section 11, since sampling may have been defective.

13. Control results of the OdontoPlex™ test system

The negative control should not yield any amplification product and thus no hybridisation signal should be observable in any of the probes.

14. Troubleshooting**Constantly weak signals or no signals at all (incl. positive control)**

- Temperature of the stringent washing solution clearly above 50°C
- PCR products not (sufficiently) denatured or renatured again prior to hybridisation
- Substrate not equilibrated to room temperature
- Wrong amount of conjugate and/or substrate used
- Insufficient thermal lysis (too short; temperature not 99°C) when using the hyplex® lysis buffer

Generally high (background) signals

- The use of insufficiently heated stringent washing solution or an incubation temperature which is too low may lead to nonspecific signals. Specific, positive signals are potentiated to the same degree, thus maintaining the contrast between nonspecific and specific signals. If there is doubt as to the evaluability of the test run (see Section 11), repetition with the correct parameters is recommended.

15. Performance data

15.1 Clinical evaluation:

a) OdontoPlex™ PAF-PCR

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Number of PCRs	OdontoPlex™ PCR		
Culture	neg.	pos.	overall result
neg.	59	15	74
pos.	0	17	17
overall result	59	32	91

Porphyromonas gingivalis

Number of PCRs	OdontoPlex™ PCR			
Culture	bdl.*	neg.	pos.	overall result
neg.	0	46	1	47
pos.	1	2	41	44
overall result	1	48	42	91

* borderline result

Fusobacterium nucleatum

Number of PCRs	OdontoPlex™ PCR		
Culture	neg.	pos.	overall result
pos.	0	91	91
neg.	0	0	0
overall result		91	91

Evaluation of OdontoPlex™ PAF-PCR

The **sensitivities** for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* were 100 %, 95 % and 100 % respectively for the three tested detections.

The **specificities** for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* were 79 % and 98 % respectively; no negative samples were available for *Fusobacterium nucleatum*.

b) OdontoPlex™ PMT-PCR

Treponema denticola

Number of PCRs	OdontoPlex™ PCR		
MicroIDent-PCR	neg.	pos.	overall result
neg.	2	0	2
pos.	0	8	8
overall result	2	8	10

Micromonas micros

Number of PCRs	OdontoPlex™ PCR		
Bacteriology	neg.	pos.	overall result
neg.	11	0	11
pos.	14	51	65
overall result	25	51	76

Prevotella intermedia

Number of PCRs	OdontoPlex™ PCR		
Bacteriology	neg.	pos.	overall result
neg.	33	5	38
pos.	4	34	38
overall result	37	39	76

Tannerella forsythia

Number of PCRs	OdontoPlex™ PCR		
Bacteriology	neg.	pos.	overall result
neg.	5	3	8
pos.	4	64	68
overall result	9	67	76

Evaluation of OdontoPlex™ PMT-PCR

The **sensitivities** for *Treponema denticola*, *Micromonas micros*, *Prevotella intermedia* and *Tannerella forsythensis* were 100 %, 78 %, 90 % and 94 % respectively for the four tested detections.

The **specificities** for the four pathogens were 100 %, 100 %, 87 % and 63 % (only 8 negative samples) respectively.

16. Literatur / References

1. Albandar, J. M., and E. M. B. Tinoco. 2002. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontol.* 2000 29:153–176.
2. Balashova, N. V., J. A. Crosby, L. Al Ghofaily, and S. C. Kachlany. 2006. Leukotoxin confers beta-hemolytic activity to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* 74:2015–2021.
3. Guthmiller, J. M., E. T. Lally, and J. Korostoff. 2001. Beyond the specific plaque hypothesis: are highly leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* a paradigm for periodontal pathogenesis? *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 12:116–124.
4. Van Winkelhoff, A. J., and K. Boutaga. 2005. Transmission of periodontal bacteria and models of infection. *J. Clin. Periodontol.* 32:16–27.
5. Doungudomdacha S, Rawlinson A, Douglas CW: Enumeration of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque samples by a quantitative-competitive PCR method. *J Med Microbiol* 2000, 49:861-867.
6. Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A: Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in parodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* 2004, 31:1034-1047.
7. Hartroth B, Seyfahrt I, Conrads G: Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameter. *Oral Microbiol Immunol* 1999, 14:326-330.

Auf Anfrage senden wir Ihnen gerne weitere Literatur.
We will gladly send you further literature on request.