

**IVD**
**Návod k použití (česky)**
**1 Určený účel**

ampliCube STD Panel 1 je kvalitativní in-vitro test ke specifickému průkazu DNA *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* a *Mycoplasma genitalium* ve vzorcích moči (nejlépe moči z prvního proudu) nebo stěrech z urogenitálního traktu humánního původu.

**2 Oblast použití**

*Chlamydia trachomatis* a *Neisseria gonorrhoeae* jsou nejčastějšími pohlavně přenosnými bakteriálními patogeny. *Chlamydia trachomatis* je obligátní intracelulární bakteriální patogen. Ve většině případů probíhá infekce bezpříznakově. U žen může neléčená infekce vést k hlubokému pánevnímu zánětu („pelvic inflammatory disease“, PID), který může být spojen s chronickými příznaky a následky, jako jsou tubární a peritoneální těhotenství a neplodnost. Infekce bakterií *Chlamydia trachomatis* může u novorozenců vést k ophthalmia neonatorum, tj. akutní konjunktivitidě novorozenců. U mužů se infekce může projevit klinickými příznaky uretritidy nebo epididymitidy.

*Neisseria gonorrhoeae* je gramnegativní diplokok. Tato bakterie je původcem kapavky, která u mužů může vést k následkům, jako je epididymitida. U žen může vyvolat hluboký pánevní zánět („pelvic inflammatory disease“), který může vést k tubárnímu a peritoneálnímu těhotenství a neplodnosti. Mimo oblast genitálu může *Neisseria gonorrhoeae* způsobovat také infekce v anorektální oblasti, ústní části hltanu a v očích.

Infekce bakterií *Mycoplasma genitalium* může u žen způsobovat zánět děložního čípku, endometriózu, uretritidu a „pelvic inflammatory disease“. U mužů může tato bakterie vyvolat příznaky uretritidy. *Mycoplasma genitalium* bývá také spojována s infekcemi sliznic dýchacího a trávicího traktu.

**3 Princip testu**

V případě tohoto testu se jedná o tzv. Real-Time PCR systém. Využívá specifické primery a značené sondy pro amplifikaci a detekci DNA *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* a *Mycoplasma genitalium*.

Aby se zajistilo, že nukleové kyseliny izolované ze vzorku pacienta neobsahují žádné látky, které inhibují PCR, přidává se během izolace DNA ke vzorku interní kontrola (IC). Tato IC se amplifikuje a detekuje ve stejném roztoku pro PCR. To umožňuje vyloučit falešně negativní výsledky testu způsobené inhibicí PCR reakce. Tato IC zároveň slouží jako důkaz extrakce nukleové kyseliny ze vzorku pacienta.

Sondy pro detekci DNA specifické pro patogen jsou značeny reportérem – barvivem FAM (*Chlamydia trachomatis*), HEX (*Neisseria gonorrhoeae*) a ATTO Rho12 (*Mycoplasma genitalium*), sondy pro detekci interní kontroly jsou značeny ATTO 647N. To umožňuje současnou detekci všech cílových sekvencí v jedné reakční směsi.

Hodnota Ct (*cycle threshold*, práh cyklu) popisuje část křivky, ve které fluorescence poprvé exponenciálně vzroste nad hodnotu pozadí.

**4 Reagencie**
**4.1 Obsah balení**

Reagencie v jednom balení stačí na 50 stanovení.

Každá sada reagentů obsahuje:

<b>P&amp;P MIX</b>	150 µl směsi Primer & Probe pro STD Panel 1 a interní kontrolu (zelená barva víčka)
<b>ENZYME</b>	600 µl enzymového mixu (bílá barva víčka) Obsahuje DNA polymerázu (součástí je zbarvena modře).
<b>CONTROL INT</b>	250 µl interní kontroly (bezbarvé víčko)
<b>CONTROL +</b>	170 µl pozitivní kontroly (červená barva víčka)
<b>CONTROL -</b>	2 x 1800 µl negativní kontroly (modrá barva víčka)
<b>INSTRU</b>	1 návod k použití

**4.2 Další potřebné reagenty, materiály a přístroje**

- MIKROGEN ampliCube Color Compensation pro Light Cycler® 480 II (Roche)
- Komerčně dostupná sada pro izolaci nukleových kyselin. Doporučuje se následující systém pro extrakci nukleových kyselin: MagNAPure® Compact, Total Nucleic Acid Kit I (Roche)
- Real-Time cykler. Doporučuje se následující cykler: Light Cycler® 480 II (Roche)
- 96jamkové PCR destičky a fólie nebo reakční nádoby (PCR clean) v závislosti na cykleru
- Mikropipety s jednorázovými hroty s filtrem, 10 µl, 20 µl, 100 µl a 1000 µl
- Vortex mixer
- Mini centrifuga
- Popř. centrifuga pro destičky
- Jednorázové ochranné rukavice bez pudru
- Chladicí blok

**5 Trvanlivost a manipulace**

- Reagencie před použitím a po použití uchovávejte při teplotě od -25 °C do -18 °C.
- Je třeba zabránit opakovanému rozmrazování a zmrazování součástí (více než desetkrát). Doporučuje se po prvním rozmrazování součástí testu alikvotovat.
- Během pracovního postupu reagenty vždy vhodným způsobem chladte (+2 °C – +8 °C).
- Součásti setu chraňte během celé doby testování před přímým slunečním světlem.
- Před zahájením testu je třeba všechny reagenty zcela rozmrazit, promíchat (krátce vortexovat) a odstředit.
- Na obalu je uvedeno datum spotřeby, při jeho překročení přestává platit záruka jakosti.
- Test smí provádět pouze školený a autorizovaný odborný personál.
- Pokud by uživatel provedl podstatné změny výrobku, resp. pokynů k jeho použití, mohlo by se pak jednat o používání mimo určený účel stanovený společností MIKROGEN.
- Křížová kontaminace může vést k falešným výsledkům testů. Vzorky od pacientů a kontroly doplňujte opatrně. Dbejte na to, aby nebyly reakční směsi zaneseny do jiných prohlubní.

**6 Varování a bezpečnostní opatření**

- Používejte pouze k in vitro diagnostice.
- S veškerými vzorky pacientů je nutné zacházet jako s potenciálně infekčními.
- Během celé doby testování je nutné používat vhodné jednorázové rukavice.
- Veškeré reagenty a materiály, které přijdou do styku s potenciálně infekčními vzorky, je nutné ošetřit vhodnými dezinfekčními přípravky nebo zlikvidovat v souladu s hygienickými předpisy. Je nutné vzít v úvahu údaje o koncentracích a inkubační doby stanovené výrobcem.
- Reagencie nenahrazujte ani neměchejte s reagenty z jiných šarží soupravy, z jiných PCR souprav MIKROGEN nebo s reagenty od jiných výrobců.
- Před provedením testu si pečlivě přečtěte celý návod k použití a řiďte se jím. Odchyly od protokolu testu uvedeného v návodu k použití mohou vést k chybným výsledkům.

**7 Odběr vzorku a příprava reagentů**
**7.1 Testovaný materiál**

Výchozím materiálem pro test ampliCube STD Panel 1 je DNA extrahovaná ze vzorků moči (nejlépe moči z prvního proudu) nebo výtěrů z močové trubice humánního původu. Kvalita přípravy nukleové kyseliny ovlivňuje výsledek testu. Je třeba zajistit, aby zvolená extrakční metoda byla kompatibilní s technologií Real-Time PCR.

**7.2 Extrakce nukleových kyselin**

Extrahujte nukleové kyseliny ze vzorku pacienta a negativní kontroly (NC). Doporučujeme počáteční objem pro extrakci 200 µl a eluční objem 50 µl. Řiďte se pokyny výrobce extrakční soupravy.

- Rozmrzte interní kontrolu (IC) (bezbarvé víčko) a negativní kontrolu (NC) (modré víčko).  
**Ujistěte se, že jsou IC i NC zcela rozmrazené. Před použitím promíchejte IC a NC krátkým vortexováním a poté je krátce odstředíte!**
- Pro účely extrakce přidejte ke každému vzorku pacienta a NC 5 µl IC. IC se má přidávat do směsi vzorku a lyzačního pufu, nikoli přímo do vzorku. (Upozornění: IC nelze používat v PCR bez extrakce!)
- Extrahujte vzorek pacienta a NC. (Upozornění: NC nelze používat v PCR bez extrakce!)
- Pozitivní kontrola se neextrahuje.

Doporučuje se následující systém pro extrakci nukleových kyselin, který byl použit pro posouzení funkčnosti:

Systém pro extrakci	Objem vzorku	Eluční objem
MagNAPure Compact (Roche) Total Nucleic Acid Kit I	200 µl	50 µl

Pokud byste raději použili jiné metody extrakce, obraťte se na výrobce a ověřte si jejich kompatibilitu.

### 7.3 Příprava master mixů

- Rozmrzte směs Primer & Probe (zelené víčko) a enzymový mix (bílé víčko). Reagencie přitom chraňte před světlem.  
**Ujistěte se, že jsou reagencie zcela rozmrazené. Před použitím promíchejte reagencie vortexováním a poté je krátce odstředíte!**
- Připravte si master mix podle následujícího pipetovacího schématu:

Součást	Master mix pro 1 reakci
Směs Primer & Probe	3 µl
Enzymový mix	12 µl
Celkový objem	15 µl

- Promíchejte celý master mix vortexováním a poté jej krátce odstředíte.
- Pro každou PCR reakci použijte 15 µl master mixů.


### 7.4 Příprava PCR reakce

- Rozmrzte pozitivní kontrolu (PC) (červená barva víčka).  
**Ujistěte se, že jsou reagencie zcela rozmrazené. Před použitím promíchejte reagencie vortexováním a poté je krátce odstředíte!**

Součást	1 reakce
Master mix připravený v kroku 7.3	15 µl
Eluát vzorku nebo eluát NC nebo PC	10 µl

- Napipetujte 10 µl eluátu vzorku do master mixů.
- Napipetujte 10 µl pozitivní kontroly (nepřipravené) do master mixů.
- Napipetujte 10 µl eluátu negativní kontroly do master mixů.

Každý běh analýzy musí obsahovat pozitivní a negativní kontrolu! Uzavřete PCR destičku adhezivní, opticky průhlednou fólií nebo reakční nádobky příslušným víčkem.

 **PCR destičky resp. reakční nádobky se musí nejméně 10 sekund vortexovat při maximálních otáčkách a následně krátce centrifugovat.**

## 8 Programování Real-Time cyklu

Test ampliCube STD Panel 1 byl vyhodnocován za použití přístroje LightCycler® 480 Instrument II (Roche).

### 8.1 Nastavení detekčních kanálů

	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria gonorrh.</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	Interní kontrola (IC)
Reportér – barvivo	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Barva	zelená	žlutá	oranžová	červená
Emise	510 nm	580 nm	610 nm	660 nm
Zhášeč	[žádný]	[žádný]	[žádný]	[žádný]

Údaje o vlnových délkách pro detekční kanály se vztahují k přístroji LightCycler® 480 II.

U přístroje LightCycler® 480 II je nutné nejprve použít kompenzaci barev, kterou poskytuje společnost MIKROGEN.

## 8.2 PCR program

Reverzní transkripce	50 °C	8 min.
Denaturace	95 °C	3 min.
<b>Amplifikace</b>	<b>45 cyklů</b>	
• Denaturace	95 °C	10 s.
• Annealing/Elongace	60 °C	45 s.

Základní informace o programování různých Real-Time cyklu naleznete v návodu k použitému cyklu. Konkrétní informace o programování Real-Time PCR cyklu při použití testu ampliCube STD Panel 1 vám poskytne výrobce.

## 9 Výsledky

Vyhodnocení dat z přístroje LightCycler® 480 II se provádělo s pomocí metody *Abs Quant/2nd Derivative Max*.

### 9.1 Validace

- Negativní kontrola musí být nižší než *Threshold* (práh). Pokud je tato kontrola kontaminovaná (pozitivní křivka), nelze průběh testu vyhodnotit.
- Pozitivní kontrola musí naopak vykazovat pozitivní křivku. Hodnota Ct pozitivní kontroly musí být < 33. Pozitivní kontrola mimo tento rozsah ukazuje na problém s amplifikací.
- Interní kontrola musí mít pozitivní křivku pro negativní vzorky a negativní kontrolu. Odchylna v průběhu křivky IC u negativních vzorků ve srovnání s negativní kontrolou naznačuje, že došlo k problému při extrakci nukleových kyselin nebo k inhibici PCR.

### 9.2 Vyhodnocení

Signály větší než *Threshold* (práh) mají být vyhodnoceny jako pozitivní výsledky. Prázdná políčka v tabulce představují negativní výsledek.

	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	Interní kontrola (IC)
Barva				
zelená	pozitivní			
žlutá		pozitivní		
oranžová			pozitivní	
červená				pozitivní*

\*V případě pozitivních signálů v detekčních kanálech pro patogeny není signál interní kontroly pro interpretaci testu nutný. Vysoká zátěž patogeny ve vzorku pacienta může vést ke sníženému nebo chybějícímu signálu pro interní kontrolu.

## 10 Meze metody, omezení

- Na výsledky testu je nutné vždy nahlížet v souvislosti s klinickým obrazem. Terapeutické důsledky nálezu je nutné vyvodit v souvislosti s klinickými daty.
- Negativní výsledek testu *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* a/nebo *Mycoplasma genitalium* nemůže infekci některými z těchto patogenů vyloučit.

## 11 Výkonové charakteristiky

### 11.1 Diagnostická citlivost a specifita

Citlivost a specifita byly stanoveny na základě stanovených pozitivních a stanovených negativních vzorků.

Tabulka 1: Stanovené pozitivní vzorky

ampliCube STD Panel 1	<i>Chlamydia trachomatis</i> (n = 10)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (n = 11)	<i>Mycoplasma genitalium</i> (n = 10)
Negativní	0	0	0
Pozitivní	10	11	10
<b>Citlivost</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

Tabulka 2: Stanovené negativní vzorky

ampliCube STD Panel 1	<i>Chlamydia trachomatis</i> (n = 50)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (n = 49)	<i>Mycoplasma genitalium</i> (n = 50)
Negativní	50	49	50
Pozitivní	0	0	0
<b>Specifita</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

### 11.2 Analytická citlivost

Mez detekce (LoD, *limit of detection*) testu ampliCube STD Panel 1 byla stanovena pomocí sériového ředění plazmidové DNA o známé koncentraci v přístroji LightCycler® 480 II System (Roche). Byla stanovena 95% mez detekce pomocí probit analýzy za použití softwaru CombiStats™ verze 5.0 (Council of Europe).

Tabulka 3: Mez detekce (LoD)

	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
LoD	16,00	11,29	11,97
95% mez detekce Genom/PCR	(9,41–39,39)	(7,09–25,70)	(7,10–28,31)

### 11.3 Analytická specifita

Údaje na webu BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)) ukazují, že vybrané primery a sondy testu amp*i*Cube STD Panel 1 specificky detekují vybrané patogeny.

Specifita byla dále stanovena zkoumáním genomové DNA/RNA dalších lidských patogenních bakterií a virů.

Tabulka 4: Bakterie a viry, které byly testovány za účelem prokázání analytické specifity testu amp*i*Cube STD Panel 1.

Bakterie	Viry
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Adenovirus A
<i>Bordetella pertussis</i>	Adenovirus sérotypu 1 (C)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Adenovirus sérotypu 3 (B)
<i>Campylobacter coli</i>	Astrovirus
<i>Citrobacter freundii</i>	Koronavirus 229E
<i>Clostridium difficile</i>	Koronavirus NL63
<i>Clostridium perfringens</i>	Koronavirus OC43
EHEC stx+	Cytomegalovirus
EIEC	Enterovirus 68
<i>Enterococcus faecalis</i>	Epstein-Barr virus
ETEC	Herpes simplex virus 1
<i>Haemophilus influenzae</i>	Herpes simplex virus 2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Lidský metapneumovirus A
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Virus chřipky A
<i>Legionella pneumophila</i>	Virus chřipky B
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Virus spalniček
<i>Morganella morganii</i>	Virus příušnic
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Norovirus G1
<i>Neisseria cinerea</i>	Norovirus G2
<i>Proteus mirabilis</i>	Parainfluenza 1
<i>Proteus vulgaris</i>	Parvovirus B19
<i>Salmonella typhimurium</i>	RSV A
	RSV B
	Rotavirus
	Varicella zoster virus

Žádný z těchto vzorků negeneroval pozitivní signál. Primery a sondy použité v testu amp*i*Cube STD Panel 1 nevykazovaly žádnou zkříženou reakci s patogeny uvedenými v tabulce 4. Interní kontrola (IC) byla u všech testů validní.

## 12 Literatura

- Chan PA, Robinette A, Montgomery M, Almonte A, Cu-Uvin S, Lonks JR, Chapin KC, Kojic EM, Hardy EJ. Extragenital Infections Caused by Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae: A Review of the Literature. Infect Dis Obstet Gynecol. 2016; 2016:5758387. doi: 10.1155/2016/5758387. Epub 2016 Jun 5. Review. PubMed PMID: 27366021; PubMed Central PMCID: PMC4913006.
- Daley GM, Russell DB, Tabrizi SN, McBride J. Mycoplasma genitalium: a review. Int J STD AIDS. 2014 Jun;25(7):475-87. doi: 10.1177/0956462413515196. Epub 2014 Feb 11. Review. PubMed PMID: 24517928.
- Hill SA, Masters TL, Wachter J. Gonorrhoea - an evolving disease of the new millennium. Microb Cell. 2016 Sep 5;3(9):371-389. doi: 10.15698/mic2016.09.524. Review. PubMed PMID: 28357376; PubMed Central PMCID: PMC5354566.
- Moi H, Blee K, Horner PJ. Management of non-gonococcal urethritis. BMC Infect Dis. 2015 Jul 29;15:294. doi: 10.1186/s12879-015-1043-4. Review. PubMed PMID: 26220178; PubMed Central PMCID: PMC4518518.
- Munoz JL, Goje OJ. Mycoplasma genitalium: An Emerging Sexually Transmitted Infection. Scientifica (Cairo). 2016;2016:7537318. doi: 10.1155/2016/7537318. Epub 2016 Feb 29. Review. PubMed PMID: 27034904; PubMed Central PMCID: PMC4789526.
- O'Connell CM, Ferone ME. Chlamydia trachomatis Genital Infections. Microb Cell. 2016 Sep 5;3(9):390-403. doi: 10.15698/mic2016.09.525. Review. PubMed PMID: 28357377; PubMed Central PMCID: PMC5354567.
- Tsevat DG, Wiesenfeld HC, Parks C, Peipert JF. Sexually transmitted diseases and infertility. Am J Obstet Gynecol. 2017 Jan;216(1):1-9. doi: 10.1016/j.ajog.2016.08.008. Review. PubMed PMID: 28007229; PubMed Central PMCID: PMC5193130

Na požádání vám rádi zašleme další literaturu.

## 13 Vysvětlení symbolů

	Obsah stačí na přípravu <n> roztoků Počet roztoků
	Směs Primer & Probe
	Enzymový mix
	Interní kontrola
	Pozitivní kontrola
	Negativní kontrola
	Návod k použití
	Čtěte návod k použití
	Obsah, obsahuje
	In vitro diagnostický prostředek
	Číslo šarže/verze
	Objednací číslo
	Použit do data Datum expirace
	Uchovávejte při teplotě x °C až y °C
	Výrobce

## 14 Údaje o výrobcí a verzi

amp <i>i</i> Cube STD Panel 1	Kat. č. 50301
Návod k použití platí od	GAACSD1003CS 2023-04
	<b>MIKROGEN GmbH</b> Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Německo Tel. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-mail <a href="mailto:mikrogen@mikrogen.de">mikrogen@mikrogen.de</a> Web <a href="http://www.mikrogen.de">www.mikrogen.de</a>



GAACSD1003