

IVD

Gebrauchsanweisung (Deutsch)

1 Zweckbestimmung

Der ampliCube STD Panel 1 ist ein qualitativer In-vitro-Test zum spezifischen Nachweis der DNA von *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* und *Mycoplasma genitalium* in Urinproben (vorzugsweise Erststrahlurin) oder Urogenitalabstrichen humanen Ursprungs.

2 Anwendungsbereich

Chlamydia trachomatis und *Neisseria gonorrhoeae* sind die am häufigsten auf sexuellem Weg übertragenen bakteriellen Krankheits-erreger.

Chlamydia trachomatis ist ein obligat intrazellulär lebendes Bakterium. In der Mehrheit der Fälle ist die Infektion symptomlos. Bei Frauen kann eine unbehandelte Infektion zu „pelvic inflammatory disease“ (PID) führen, die mit chronischen Symptomen und Folgeerscheinungen wie Eileiter- und Bauchhöhlenschwangerschaften und Infertilität einhergehen kann. Eine Infektion mit *Chlamydia trachomatis* kann bei Neugeborenen zu Ophthalmia neonatorum führen. Bei Männern kann sich die Infektion mit den klinischen Symptomen einer Urethritis oder Epididymitis äußern.

Neisseria gonorrhoeae ist ein gramnegatives, diploides Bakterium. Das Bakterium ist der Erreger der Gonorrhoe, die bei Männern als Folgeerscheinungen zu Epididymitis und bei Frauen zu „pelvic inflammatory disease“, Infertilität und Eileiter- und Bauchhöhlenschwangerschaften führen kann. Außerhalb des Genitalbereichs kann *Neisseria gonorrhoeae* Infektionen im Bereich des Anorectums, des Oropharynx und der Augen verursachen.

Eine Infektion mit *Mycoplasma genitalium* kann bei Frauen Entzündungen des Gebärmutterhalses, Endometriose, Urethritis und „pelvic inflammatory disease“ verursachen. Bei Männern kann das Bakterium zu Symptomen einer Urethritis führen. *Mycoplasma genitalium* wird auch mit Infektionen der Schleimhäute im respiratorischen sowie gastrointestinalen Bereich in Verbindung gebracht.

3 Testprinzip

Bei dem Test handelt es sich um ein Real-Time (Echtzeit) PCR-System. Es verwendet spezifische Primer und markierte Sonden für die Amplifikation und Detektion der DNA von *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* und *Mycoplasma genitalium*.

Um sicherzustellen, dass die aus der Patientenprobe isolierten Nukleinsäuren keine PCR-inhibierenden Substanzen enthalten, wird der Probe während der DNA-Isolierung eine Interne Kontrolle (IC) zugesetzt. Diese IC wird im selben PCR-Ansatz amplifiziert und detektiert. So können falsch negative Testergebnisse aufgrund einer Inhibition der PCR-Reaktion ausgeschlossen werden. Gleichzeitig dient die IC als Nachweis der Nukleinsäure-Extraktion aus der Patientenprobe. Sonden für die Detektion der erregerspezifischen DNA sind mit dem Reporter-Farbstoffen FAM (*Chlamydia trachomatis*), HEX (*Neisseria gonorrhoeae*) und ATTO Rho12 (*Mycoplasma genitalium*) markiert, Sonden für die Detektion der Internen Kontrolle mit ATTO 647N. Dadurch ist die simultane Detektion aller Zielsequenzen in einem Reaktionsansatz möglich.

Der Ct-Wert (*cycle threshold*) beschreibt den Teil der Kurve, in dem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt.

4 Reagenzien

4.1 Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 50 Bestimmungen. Jeder Reagenziensatz enthält:

P&P MIX	150 µl Primer & Probe-Mix für STD Panel 1 und Interne Kontrolle (Deckelfarbe grün)
ENZYME	600 µl Enzym Mix (Deckelfarbe weiß) Enthält DNA-Polymerase. (Komponente ist blau eingefärbt.)
CONTROL INT	250 µl Interne Kontrolle (Deckelfarbe farblos)
CONTROL +	170 µl Positivkontrolle (Deckelfarbe rot)
CONTROL -	2 x 1800 µl Negativkontrolle (Deckelfarbe blau)
INSTRU	1 Gebrauchsanweisung

4.2 Zusätzlich benötigte Reagenzien, Materialien und Geräte

- MIKROGEN ampliCube Color Compensation für Light Cycler® 480 II (Roche)
- Kommerzieller Nukleinsäure-Isolierungs-Kit. Es wird folgendes Nukleinsäureextraktions-System empfohlen: MagNAPure® Compact, Total Nucleic Acid Kit I (Roche)
- Real-Time Cycler. Es wird folgender Cycler empfohlen: Light Cycler® 480 II (Roche)
- 96 well PCR-Platten und Folien oder Reaktionsgefäße (PCR-clean), abhängig vom Cycler
- Mikropipetten mit Einwegspitzen mit Filter 10 µl, 20 µl, 100 µl und 1000 µl
- Vortex-Mixer
- Mini-Zentrifuge
- Ggf. Plattenzentrifuge
- Einweg-Schutzhandschuhe puderfrei
- Kühlblock

5 Haltbarkeitsdauer und Handhabung

- Reagenzien vor und nach Gebrauch zwischen -25°C und -18°C lagern.
- Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Komponenten (mehr als zehnmal) muss vermieden werden. Aliquotierung der Testkomponenten nach dem ersten Auftauen wird empfohlen.
- Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (+2°C – +8°C).
- Kitkomponenten während der gesamten Testdurchführung vor direktem Sonnenlicht schützen.
- Vor Testbeginn alle Reagenzien vollständig auftauen, mischen (kurzes Vortexen) und abzentrifugieren.
- Die Packungen tragen ein Verfallsdatum, nach dessen Erreichen keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden kann.
- Der Test ist nur von geschultem und autorisiertem Fachpersonal durchzuführen.
- Bei substanziellen Änderungen am Produkt bzw. der Anwendungsvorschrift durch den Anwender kann die Anwendung außerhalb der von MIKROGEN vorgegebenen Zweckbestimmung liegen.
- Kreuzkontamination kann zu falschen Testergebnissen führen. Fügen Sie Patientenproben und Kontrollen sorgfältig zu. Achten Sie darauf, dass Reaktionsansätze nicht in andere Vertiefungen verschleppt werden.

6 Warnungen und Sicherheitsvorkehrungen

- Nur für die In-vitro-Diagnostik verwenden.
- Sämtliche Patientenproben müssen als potenziell infektiös behandelt werden.
- Während des gesamten Testverfahrens müssen geeignete Einweg-Handschuhe getragen werden.
- Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potenziell infektiösen Proben in Berührung kommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder entsprechend den Hygienevorschriften entsorgt werden. Die Konzentrationsangaben und Inkubationszeiten der Hersteller müssen beachtet werden.
- Ersetzen oder mischen Sie die Reagenzien nicht mit Reagenzien aus anderen Kit-Chargen, anderen MIKROGEN PCR-Kits oder mit Reagenzien anderer Hersteller.
- Vor Durchführung des Tests die gesamte Gebrauchsanweisung durchlesen und sorgfältig befolgen. Abweichungen vom in der Gebrauchsanweisung aufgeführten Testprotokoll können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

7 Probenentnahme und Reagenzien-Vorbereitung

7.1 Probenmaterial

Ausgangsmaterial für den ampliCube STD Panel 1 ist DNA extrahiert aus Urinproben (vorzugsweise Erststrahlurin), oder Hamnröhrenabstrichen humanen Ursprungs. Die Qualität der Nukleinsäurepräparation hat Einfluss auf das Testergebnis. Es muss sichergestellt werden, dass die gewählte Extraktionsmethode vereinbar mit der Real-Time PCR-Technologie ist.

7.2 Extraktion der Nukleinsäuren

Extrahieren Sie die Nukleinsäuren aus der Patientenprobe und der Negativkontrolle (NC). Wir empfehlen ein Startvolumen für die Extraktion von 200 µl und ein Elutionsvolumen von 50 µl. Folgen Sie den Anweisungen des Herstellers des Extraktionskits.

1. Tauen Sie die Interne Kontrolle (IC) (Deckelfarbe farblos) und die Negativkontrolle (NC) (Deckelfarbe blau) auf.
Stellen Sie sicher, dass die IC und die NC vollständig aufgetaut sind. Mischen Sie die IC und die NC vor Gebrauch durch kurzes Vortexen und zentrifugieren Sie kurz ab!
2. Fügen Sie bei der Extraktion jeder Patientenprobe und der NC 5 µl IC zu. Die IC soll dem Proben-Lysepuffer-Mix und nicht direkt dem Probenmaterial zugesetzt werden. (Hinweis: die IC kann nicht ohne Extraktion in die PCR eingesetzt werden!)
3. Extrahieren Sie die Patientenproben und die NC. (Hinweis: die NC kann nicht ohne Extraktion in die PCR eingesetzt werden!)
4. Die Positivkontrolle wird nicht extrahiert.

Folgendes Nukleinsäure-Extraktionssystem wird empfohlen und wurde für die Leistungsbewertung verwendet:

Extraktionssystem	Probenvolumen	Elutionsvolumen
MagNAPure Compact (Roche) Total Nucleic Acid Kit I	200 µl	50 µl

Möchten Sie andere Extraktionsmethoden verwenden, so wenden Sie sich bitte an den Hersteller, um die Kompatibilität zu klären.

7.3 Ansetzen des Mastermixes

1. Tauen Sie den Primer & Probe-Mix (Deckelfarbe grün) und den Enzym Mix (Deckelfarbe weiß) auf. Schützen Sie dabei die Reagenzien vor Licht.
Stellen Sie sicher, dass die Reagenzien vollständig aufgetaut sind. Mischen Sie die Reagenzien vor dem Gebrauch durch Vortexen und zentrifugieren Sie kurz ab!
2. Setzen Sie den Mastermix nach folgendem Pipettierschema an:

Komponente	Mastermix für 1 Reaktion
Primer & Probe-Mix	3 µl
Enzym Mix	12 µl
Gesamtvolumen	15 µl

3. Mischen Sie den kompletten Mastermix durch Vortexen und zentrifugieren Sie kurz ab.
4. Legen Sie 15 µl Mastermix für jede PCR-Reaktion vor.

7.4 Ansetzen der PCR-Reaktion

1. Tauen Sie die Positivkontrolle (PC) (Deckelfarbe rot) auf.
Stellen Sie sicher, dass die Reagenzien vollständig aufgetaut sind. Mischen Sie die Reagenzien vor dem Gebrauch durch Vortexen und zentrifugieren Sie kurz ab!

Komponente	1 Reaktion
Mastermix aus 7.3	15 µl
Proben-Eluat oder Eluat der NC oder die PC	10 µl

2. Pipettieren Sie je 10 µl des Proben-Eluates zum Mastermix.
3. Pipettieren Sie 10 µl der Positivkontrolle (nicht präpariert) zum Mastermix.
4. Pipettieren Sie 10 µl des Eluates der Negativkontrolle zum Mastermix.

Jeder Lauf muss eine Positiv- und eine Negativkontrolle beinhalten! Verschließen Sie die PCR-Platte mit einer adhäsiven, optischen Folie bzw. die Reaktionsgefäße mit den vorgesehenen Deckeln.



Die PCR-Platten bzw. Reaktionsgefäße müssen mind. 10 Sek. mit maximaler Drehzahl gevortext und anschließend kurz zentrifugiert werden.

8 Programmierung des Real-Time Cyclers

Der ampliCube STD Panel 1 wurde mit dem LightCycler® 480 Instrument II (Roche) evaluiert.

8.1 Einstellung der Detektionskanäle

	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria gonorrh.</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	Interne Kontrolle (IC)
Reporterfarbstoff	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Farbe	grün	gelb	orange	rot
Emission	510 nm	580 nm	610 nm	660 nm
Quencher	[none]	[none]	[none]	[none]

Angaben zu den Wellenlängen der Detektionskanäle beziehen sich auf den LightCycler® 480 II.

Beim LightCycler® 480 II ist es notwendig vorab eine Color Compensation zu verwenden, die von Mikrogen zur Verfügung gestellt wird.

8.2 PCR-Programm

Reverse Transkription	50°C	8 Min.
Denaturierung	95°C	3 Min.
Amplifikation	45 Zyklen	
• Denaturierung	95°C	10 Sek.
• Annealing/Elongation	60°C	45 Sek.

Grundlegende Informationen zur Programmierung der verschiedenen Real-Time Cycler entnehmen Sie bitte der Anleitung des verwendeten Cyclers. Für spezielle Informationen zur Programmierung des Real-Time PCR-Cyclers bei Verwendung des ampliCube STD Panel 1 kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

9 Ergebnisse

Die Datenauswertung am LightCycler® 480 II erfolgte mit der *Abs Quant/2nd Derivative Max* Methode.

9.1 Validierung

1. Die Negativkontrolle muss unterhalb des *Thresholds* liegen. Bei einer Kontamination dieser Kontrolle (positiver Kurvenverlauf) ist der Testlauf nicht auswertbar.
2. Die Positivkontrolle muss einen positiven Kurvenverlauf zeigen. Der Ct-Wert der Positivkontrolle muss < 33 sein. Eine Positivkontrolle außerhalb dieses Bereichs gibt einen Hinweis auf ein Problem bei der Amplifikation.
3. Die Interne Kontrolle bei negativen Proben und in der Negativkontrolle muss einen positiven Kurvenverlauf zeigen. Eine Abweichung im Kurvenverlauf der IC in einer negativen Probe im Vergleich zur Negativkontrolle gibt einen Hinweis auf ein Problem bei der Extraktion bzw. Inhibition der PCR.

9.2 Auswertung

Signale größer als der *Threshold* werden als positive Ergebnisse gewertet. Leere Felder in der Tabelle gelten als negatives Ergebnis.

	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	Interne Kontrolle (IC)
Farbe				
grün	positiv			
gelb		positiv		
orange			positiv	
rot				positiv*

*Im Falle positiver Signale in den Detektionskanälen der Pathogene wird das Signal der Internen Kontrolle nicht für die Testinterpretation benötigt. Eine hohe Erregerlast in der Patientenprobe kann zu einem verminderten oder fehlenden Signal für die Interne Kontrolle führen.

10 Grenzen der Methode, Einschränkungen

- Testergebnisse sind immer in Zusammenhang mit dem klinischen Bild zu sehen. Therapeutische Konsequenzen der Befundung sind im Zusammenhang mit den klinischen Daten zu ziehen.
- Ein negatives *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* und/oder *Mycoplasma genitalium* Testresultat kann eine Infektion mit den jeweiligen Erregern nicht ausschließen.

11 Leistungsmerkmale

11.1 Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Die Sensitivität und Spezifität wurden anhand von definiert positiven und definiert negativen Proben bestimmt.

Tabelle 1: Definiert positive Proben

ampliCube STD Panel 1	<i>Chlamydia trachomatis</i> (n=10)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (n=11)	<i>Mycoplasma genitalium</i> (n=10)
Negativ	0	0	0
Positiv	10	11	10
Sensitivität	100%	100%	100%

Tabelle 2: Definiert negative Proben

ampliCube STD Panel 1	<i>Chlamydia trachomatis</i> (n=50)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (n=49)	<i>Mycoplasma genitalium</i> (n=50)
Negativ	50	49	50
Positiv	0	0	0
Spezifität	100%	100%	100%

11.2 Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze (LoD) des ampliCube STD Panel 1 wurde mit Verdünnungsreihen von Plasmid-DNA bekannter Konzentration auf einem LightCycler® 480 II System (Roche) ermittelt. Die 95% Nachweisgrenze wurde mittels Probit Analyse mit der CombiStats™ Version 5.0 Software (Council of Europe) bestimmt.

Tabelle 3: Nachweisgrenze (LoD)

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

11.3 Analytische Spezifität

Die BLAST Suche (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) zeigt, dass die ausgewählten Primer und Sonden des ampliCube STD Panel 1 die ausgewählten Pathogene spezifisch detektieren. Darüber hinaus wurde die Spezifität durch Untersuchung genomischer DNA/RNA von weiteren humanpathogenen Bakterien und Viren ermittelt.

Tabelle 4: Bakterien und Viren, die getestet wurden, um die analytische Spezifität des ampliCube STD Panel 1 zu zeigen.

Bakterien	Viren
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Adenovirus A
<i>Bordetella pertussis</i>	Adenovirus Serotype 1 (C)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Adenovirus Serotype 3 (B)
<i>Campylobacter coli</i>	Astrovirus
<i>Citrobacter freundii</i>	Coronavirus 229E
<i>Clostridium difficile</i>	Coronavirus NL63
<i>Clostridium perfringens</i>	Coronavirus 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>	Human Metapneumovirus A
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Influenza A virus
<i>Legionella pneumophila</i>	Influenza B virus
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Measles virus
<i>Morganella morganii</i>	Mumps virus
<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

Keine dieser Proben zeigte ein positives Signal. Die im ampliCube STD Panel 1 verwendeten Primer und Sonden zeigten keine Kreuzreaktionen mit den in Tabelle 4 aufgeführten Erregern. Die Interne Kontrolle (IC) war bei allen Testungen valide.

12 Literatur

- 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

Auf Anforderung senden wir Ihnen gerne weiterführende Literatur zu.

13 Erläuterung der Symbole

	Inhalt ist ausreichend für <n> Ansätze Anzahl der Ansätze
	Primer & Probe-Mix
	Enzym Mix
	Interne Kontrolle
	Positivkontrolle
	Negativkontrolle
	Gebrauchsanweisung
	Gebrauchsanweisung beachten
	Inhalt, enthält
	In-vitro-Diagnostikum
	Chargen-/Versionsnummer
	Bestell-Nummer
	Verwendbar bis Verfallsdatum
	Lagerung bei x°C bis y°C
	Hersteller

14 Hersteller- und Versionsdaten

ampliCube STD Panel 1	Artikel-Nr. 50301
Gebrauchsanweisung gültig ab	GAACSD1003D 2023-04
	MIKROGEN GmbH Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Germany Tel. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-Mail mikrogen@mikrogen.de Internet www.mikrogen.de
	0483



GAACSD1003