

IVD

Instrucciones de uso (español)

1 Uso previsto

El ampliCube STD Panel 1 es un test de calidad in vitro usado para la comprobación específica del ADN de la *chlamydia trachomatis*, *neisseria gonorrhoeae* y *mycoplasma genitalium* en muestras de orina (preferencialmente orina de la primera micción) o de frotis urogenitales de origen humano.

2 Campo de aplicación

Chlamydia trachomatis y *neisseria gonorrhoeae* son los agentes patógenos que se transmiten con mayor frecuencia por contacto sexual.

Chlamydia trachomatis es una bacteria que vive obligadamente en las regiones intracelulares. En la mayoría de los casos la infección no presenta síntomas. Una infección no tratada puede conducir en mujeres a la enfermedad pélvica inflamatoria (PID = *pelvic inflammatory disease*) que se presenta con síntomas crónicos y trastornos consecuentes tales como un embarazo falopiano o intraperitoneal e infertilidad. Una infección con *chlamydia trachomatis* puede conducir en recién nacidos a una blenorrea neonatal. La infección en hombres puede presentarse con los síntomas clínicos de una uretritis o de una epididimitis.

La *neisseria gonorrhoeae* es una bacteria gramnegativa diploide. La bacteria es el agente patógeno de la gonorrea que puede conducir en hombres a la epididimitis y en mujeres a la „*pelvic inflammatory disease*“, a la infertilidad y a un embarazo falopiano o intraperitoneal. La *neisseria gonorrhoeae* puede causar infecciones fuera de la zona genital, a saber en la región anorectal, onofaríngea y los ojos. Una infección con la *mycoplasma genitalium* puede causar en mujeres inflamaciones en el cuello uterino, endometriosis, uteritis y „*pelvic inflammatory disease*“. La bacteria puede conducir en hombres a síntomas de una uretritis. La *mycoplasma genitalium* se asocia también con infecciones de la mucosa en las regiones respiratorias y gastrointestinales.

3 Principio del test

El test es un sistema PCR real time (tiempo real). Utiliza primers (iniciadores) específicos y sondas marcadas para la amplificación y detección del ADN de la *chlamydia trachomatis*, *neisseria gonorrhoeae* y *mycoplasma genitalium*.

Para asegurar que los ácidos nucleicos aislados de la prueba del paciente no contengan sustancias inhibitoras de la PCR, se somete la prueba a un control interno (IC) durante la aislación del ADN. Este IC se amplifica y detecta en la misma mezcla reactiva de PCR. De esta manera es posible excluir resultados negativos incorrectos del test debidos a una inhibición de la reacción PCR. El IC se usa al mismo tiempo para la comprobación de la extracción del ácido nucleico de la prueba del paciente.

Las sondas para la detección específica del agente patógeno del ADN están marcadas con el colorante reportero FAM (*chlamydia trachomatis*), HEX (*neisseria gonorrhoeae*) y ATTO Rho12 (*mycoplasma genitalium*) y las sondas para la detección del control interno están marcadas con ATTO 647N. De este modo es posible la detección simultánea de todas las secuencias objetivo en una mezcla de reacción.

El valor Ct (*cycle threshold*) describe la parte de la curva, en la cual la fluorescencia aumenta por primera vez exponencialmente superando el valor de fondo.

4 Reactivos

4.1 Contenido del envase

Los reactivos de un envase alcanzan para 50 comprobaciones.

Cada set de reactivos contiene:

P&P MIX	150 µl de Primer & Mezcla de prueba para el STD Panel 1 y el control interno (tapón verde)
ENZYME	600 µl mezcla de enzimas (tapón blanco) Contiene polimerasa de ADN. (El componente está coloreado de azul.)
CONTROL INT	250 µl control interno (tapón incoloro)
CONTROL +	170 µl control positivo (tapón rojo)
CONTROL -	2 x 1800 µl control negativo (tapón azul)
INSTRU	1 Instrucciones de uso

4.2 Reactivos, materiales y aparatos requeridos adicionalmente

- MIKROGEN ampliCube Color Compensation para Light Cycler® 480 II (Roche)
- Kit comercial para aislar el ácido nucleico. Recomendamos utilizar el siguiente sistema de extracción del ácido nucleico: MagNAPure® Compact, Total Nucleic Acid Kit I (Roche)
- Termociclador en tiempo real. Recomendamos utilizar el siguiente termociclador: Light Cycler® 480 II (Roche)
- Placas para PCR de 96 pocillos y láminas o recipientes de reactivo (PCR-clean), en función del termociclador
- Micropipetas con puntas desechables y filtros de 10 µl, 20 µl, 100 µl y 1000 µl
- Mezclador tipo Vórtex
- Minicentrífugadora
- En caso dado, centrifugadoras de placas
- Guantes protectores desechables exentos de talco
- Bloque de refrigeración

5 Durabilidad y manejo

- Almacenar los reactivos antes y después de su uso entre -25°C y -18°C.
- Es preciso evitar descongelar y volver a congelar repetidas veces los componentes (no más de diez veces). Recomendamos llevar a cabo un cálculo alícuota de los componentes del test después de la primera descongelación.
- Durante los pasos de trabajo, los reactivos deben mantenerse siempre refrigerados a una temperatura adecuada (+2°C – +8°C).
- Proteger los componentes del kit contra la luz solar directa, durante toda la ejecución del análisis.
- Antes de iniciar el test es necesario descongelar completamente todos los reactivos, mezclarlos brevemente con el Vortex y luego centrifugarlos.
- Los envases llevan una fecha de caducación. A partir de esta fecha rechazaremos todo reclamo por garantía de calidad.
- El análisis debe ser llevado a cabo exclusivamente por personal profesional autorizado.
- Si el usuario ha llevado a cabo modificaciones sustanciales del producto o bien de la prescripción de uso, es posible que la aplicación del producto esté en desacuerdo con el uso previsto especificado por MIKROGEN.
- Una contaminación cruzada puede conducir a resultados incorrectos del test. Agregar cuidadosamente las pruebas de pacientes y los controles. Tomar cuidado de evitar que las mezclas de reactivos se depositen en otras concavidades.

6 Advertencias y medidas de seguridad

- Utilizar el producto exclusivamente para el diagnóstico in vitro.
- Todas las pruebas de pacientes deben manejarse como si fueran potencialmente infecciosas.
- Durante todo el análisis es necesario llevar guantes desechables adecuados.
- Todos los reactivos y materiales que entran en contacto con las pruebas potencialmente infecciosas deben tratarse con desinfectantes adecuados o deben desecharse de acuerdo con las prescripciones de higiene vigentes en el lugar de aplicación. Es necesario observar las concentraciones y tiempos de incubación especificados por el fabricante.
- Nunca reemplazar ni mezclar los reactivos con reactivos de otros lotes de kits, con otros kits de PCR de MIKROGEN ni con reactivos de otros fabricantes.
- Leer detenidamente y observar las instrucciones de uso, antes de iniciar el análisis. La no observancia del protocolo indicado en las instrucciones de uso puede conducir a resultados incorrectos.

7 Toma de pruebas y preparación de los reactivos

7.1 Material de pruebas

El material inicial para el ampliCube STD Panel 1 es el ADN extraído de pruebas de orina (preferencialmente orina de la primera micción) o de frotis del conducto uretral de origen humano. La calidad de la preparación del ácido nucleico influye en el resultado del test. Es necesario asegurar que el método de extracción elegido sea compatible con la tecnología PCR en tiempo real.

7.2 Extracción de los ácidos nucleicos

Extraiga usted los ácidos nucleicos de la prueba del paciente y del control negativo (NC). Para la extracción recomendamos un volumen inicial de 200 µl y para la elución un volumen de 50 µl. Seguir las instrucciones del fabricante del kit de extracción.

- Descongelar el control interno (IC) (tapón incoloro) y el control negativo (NC) (tapón azul).
Asegurarse que el IC y el NC estén completamente descongelados. ¡Antes del uso, mezclar el IC y el NC brevemente con el Vortex y luego centrifugarlos durante corto tiempo!
- Durante la extracción agregar a cada prueba del paciente y al NC 5 µl de IC. El IC debe agregarse a la mezcla del tampón para lisis de las pruebas y no directamente al material de pruebas. (Nota: ¡No es posible aplicar el IC a la PCR sin llevar a cabo la extracción!)
- Extraer las pruebas del paciente y el NC. (Nota: ¡No es posible aplicar el NC a la PCR sin llevar a cabo la extracción!)
- El control positivo no se extrae.

Recomendamos utilizar el siguiente sistema de extracción del ácido nucleico que se usó para evaluar la prestación:

Sistema de extracción	Volumen de pruebas	Volumen de elución
MagNAPure Compact (Roche) Total Nucleic Acid Kit I	200 µl	50 µl

Si usted desea utilizar otros métodos de extracción, consulte previamente al fabricante para aclarar la compatibilidad.

7.3 Hacer la mezcla maestra

- Descongelar el Primer & Mezcla de prueba (tapón verde) y la mezcla de enzimas (tapón blanco). Proteger los reactivos contra la luz.
Asegurarse que los reactivos estén completamente descongelados. ¡Antes del uso, mezclar los reactivos con el Vortex y luego centrifugarlos durante un breve tiempo!
- Preparar la mezcla maestra de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Componente	Mezcla maestra para 1 reacción
Primer & Mezcla de prueba	3 µl
Mezcla de enzimas	12 µl
Volumen total	15 µl

- Mezclar con el Vortex la mezcla maestra y luego centrifugarla durante un breve tiempo.
- Preparar 15 µl de mezcla maestra para cada reacción de PCR.

7.4 Preparar la reacción de PCR

- Descongelar el control positivo (PC) (tapón rojo).
Asegurarse que los reactivos estén completamente descongelados. ¡Antes del uso, mezclar los reactivos con el Vortex y luego centrifugarlos durante un breve tiempo!

Componente	1 Reacción
Mezcla maestra de 7.3	15 µl
Eluato de prueba o eluato de NC o bien PC	10 µl

- Pipetear 10 µl del eluato de prueba en la mezcla maestra.
- Pipetear 10 µl del control positivo (no preparado) en la mezcla maestra.
- Pipetear 10 µl del eluato de control negativo en la mezcla maestra.

¡Cada protocolo debe contener un control positivo y un control negativo!

Cerrar la placa PCR con un folio óptico adhesivo y los recipientes de reactivo con los tapones previstos.



Las placas de RCP o los tubos de reacción se deben agitar en vórtice a máxima velocidad durante al menos 10 segundos y luego se deben centrifugar brevemente.

8 Programación del termociclador en tiempo real

El ampliCube STD Panel 1 se evaluó con el LightCycler® 480 Instrument II (Roche).

8.1 Ajuste de los canales de detección

	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria gonorrh.</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	Control interno (IC)
Colorante reportero	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Color	verde	amarillo	naranja	rojo
Emisión	510 nm	580 nm	610 nm	660 nm
Extintor	[ninguno]	[ninguno]	[ninguno]	[ninguno]

Las especificaciones respecto a las longitudes de onda de los canales de detección se refieren al LightCycler® 480 II.

Para el LightCycler® 480 II es necesario utilizar previamente una compensación de color provista por Mikrogen.

8.2 Programa PCR

Transcripción inversa	50°C	8 min.
Desnaturalización	95°C	3 min.
Amplificación	45 ciclos	
• Desnaturalización	95°C	10 seg.
• Recocido/Elongación	60°C	45 seg.

Para informaciones básicas sobre la programación de los diferentes termocicladores en tiempo real véase el manual de instrucciones del respectivo termociclador. Para informaciones específicas sobre la programación del termociclador PCR en tiempo real utilizando el ampliCube STD Panel 1 sírvase contactar al fabricante.

9 Resultados

La evaluación de los datos en el LightCycler® 480 II tuvo lugar con el método *Abs Quant/2nd Derivative Max*.

9.1 Validación

- El control negativo debe encontrarse bajo el *límite*. Si estos controles se contaminan (curva positiva) el test no será evaluable.
- El control positivo debe presentar una curva positiva. El valor Ct del control positivo debe ser < 33. Si el control positivo se encuentra fuera de esta tolerancia, significa que hay un problema con la amplificación.
- La curva debe ser positiva en el control interno de pruebas negativas y en el control negativo. Si hay desviaciones en la curva del IC en una prueba negativa en comparación con el control negativo, significa que hay un problema en la extracción o inhibición de la PCR.

9.2 Evaluación

Las señales mayores que el *límite* se evalúan como resultados positivos. Los campos vacíos se evalúan como resultado negativo.

	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	Internos Controles (IC)
Color				
verde	positivo			
amarillo		positivo		
naranja			positivo	
rojo				positivo*

*Si los canales de detección presentan señales positivas, no se requiere la señal del control interno para interpretar el test. Si la prueba del paciente presenta una gran carga de agente patógeno, puede que se reduzca o que falte la señal para el control interno.

10 Límites del método, restricciones

- Los resultados del test deben contemplarse siempre en relación con los hallazgos clínicos. Las consecuencias terapéuticas del hallazgo deben contemplarse en relación con los datos clínicos.
- Un resultado negativo de la *chlamydia trachomatis*, *neisseria gonorrhoeae* y/o *mycoplasma genitalium* no significa que puede excluirse una infección con los respectivos agentes patógenos.

11 Características de la prestación

11.1 Sensibilidad y especificidad diagnósticas

La sensibilidad y la especificidad se determinaron mediante pruebas definidas como positivas y pruebas definidas como negativas.

Tabla 1: Define pruebas positivas

ampliCube STD Panel 1	<i>Chlamydia trachomatis</i> (n=10)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (n=11)	<i>Mycoplasma genitalium</i> (n=10)
Negativo	0	0	0
Positivo	10	11	10
Sensibilidad	100%	100%	100%

Tabla 2: Define pruebas negativas

ampliCube STD Panel 1	<i>Chlamydia trachomatis</i> (n=50)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (n=49)	<i>Mycoplasma genitalium</i> (n=50)
Negativo	50	49	50
Positivo	0	0	0
Especificidad	100%	100%	100%

11.2 Sensibilidad analítica

El límite de comprobación (LoD) del ampliCube STD Panel 1 se determinó mediante una serie de diluciones de ADN de plasmidio de concentración conocida en un sistema LightCycler® 480 II (Roche). El límite de comprobación de 95% se determinó mediante un análisis Probit con el software CombiStats™ Versión 5.0 (Council of Europe).

Tabla 3: Límite de comprobación (LoD)

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

11.3 Especificidad analítica

La búsqueda BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) indica que los primers y sondas seleccionados del ampliCube STD Panel 1 detectan específicamente los patógenos seleccionados.

La especificidad se determinó además mediante el estudio de los ADN/ARN genómicos de otras bacterias y virus y patógenos humanos.

Tabla 4: Bacterias y virus analizados para indicar la especificidad analítica del ampliCube STD Panel 1.

Bacterias	Virus
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Adenovirus A
<i>Bordetella pertussis</i>	Adenovirus serotipo 1 (C)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Adenovirus serotipo 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>	Virus Epstein-Barr
ETEC	Virus herpes simplex 1
<i>Haemophilus influenzae</i>	Virus herpes simplex 2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Metapneumovirus A humano
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Virus influenza A
<i>Legionella pneumophila</i>	Virus influenza B
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Virus Measles
<i>Morganella morganii</i>	Virus de paperas
<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
	Virus de varicela-zoster

Ninguna de estas pruebas presentó una señal positiva. Los primers y sondas utilizados en el ampliCube STD Panel 1 no mostraron reacción cruzada alguna con los agentes patógenos indicados en la tabla 4. El control interno (IC) era válido en todos los análisis.

12 Bibliografía

- 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

Bajo consulta enviamos a usted complacidos literatura más detallada.

13 Explicación de los símbolos

	El contenido es suficiente para <n> análisis Cantidad de análisis
	Primer & Mezcla de prueba
	Mezcla de enzimas
	Control interno
	Control positivo
	Control negativo
	Instrucciones de uso
	Observar las instrucciones de uso
	Contenido, contiene
	Medio de diagnóstico in vitro
	Número de lote/versión
	Número de pedido
	Utilizable hasta Fecha de vencimiento
	Almacenamiento desde x°C hasta y°C
	Fabricante

14 Datos del fabricante y de la versión

ampliCube STD Panel 1	Nº de artículo 50301
Instrucciones de uso válido a partir de	GAACSD1003ES 2023-04
	MIKROGEN GmbH Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Alemania Tel. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-Mail mikrogen@mikrogen.de Internet www.mikrogen.de



GAACSD1003