

IVD

Istruzioni per l'uso (italiano)

1 Destinazione d'uso

L'ampliCube STD Panel 1 è un test qualitativo in vitro per il rilevamento specifico del DNA di *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Mycoplasma genitalium* in campioni di urina (di preferenza urina primaria) o tamponi urogenitali di origine umana.

2 Campo d'applicazione

Chlamydia trachomatis e *Neisseria gonorrhoeae* sono i più comuni agenti patogeni batterici a trasmissione sessuale.

Chlamydia trachomatis è un batterio intracellulare obbligato. L'infezione è asintomatica nella maggioranza dei casi. Nelle donne, l'infezione non trattata può provocare "pelvic inflammatory disease" (PID, malattia infiammatoria pelvica), che può essere accompagnata da sintomi cronici e gravi conseguenze, quali gravidanze ectopiche ed extrauterine e infertilità. Un'infezione con *Chlamydia trachomatis* può causare oftalmia neonatale nel neonato. Negli uomini, l'infezione può manifestarsi con i sintomi clinici di un'uretrite o epididimite.

Neisseria gonorrhoeae è un batterio diploide Gram-negativo. Il batterio è l'agente eziologico della gonorrea, che negli uomini può avere conseguenze quali l'epididimite e nelle donne può provocare "pelvic inflammatory disease" (malattia infiammatoria pelvica), infertilità e gravidanze ectopiche ed extrauterine. Le manifestazioni dell'infezione da *Neisseria gonorrhoeae* non localizzate nella regione genitale possono coinvolgere la regione ano-rettale, l'orofaringe e gli occhi.

Nelle donne, l'infezione da *Mycoplasma genitalium* può provocare infiammazioni della cervice, endometriosi, uretrite e "pelvic inflammatory disease". Negli uomini il batterio può portare ai sintomi di un'uretrite. *Mycoplasma genitalium* viene correlato anche a infezioni delle mucose nella regione respiratoria e gastrointestinale.

3 Principio del test

Il test è un sistema Real-Time PCR (reazione a catena della polimerasi in tempo reale), che utilizza primer specifici e sonde marcate per l'amplificazione e il rilevamento del DNA di *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Mycoplasma genitalium*.

Per assicurare che gli acidi nucleici isolati dal campione del paziente non contengano sostanze in grado di inibire la PCR, durante l'isolamento del DNA al campione viene aggiunto un controllo interno (IC). Tale IC viene amplificato e rilevato nella stessa determinazione PCR. In questo modo è possibile escludere risultati del test falsi negativi causati dall'inibizione della reazione PCR. L'IC consente al contempo di attestare l'estrazione degli acidi nucleici dal campione del paziente. Le sonde per il rilevamento del DNA specifico dell'agente patogeno sono marcate con i coloranti reporter FAM (*Chlamydia trachomatis*), HEX (*Neisseria gonorrhoeae*) e ATTO Rho12 (*Mycoplasma genitalium*), le sonde per il rilevamento del controllo interno con ATTO 647N. In questo modo nella stessa porzione di reazione è possibile rilevare simultaneamente tutte le sequenze target.

Il valore Ct (*cycle threshold*) descrive la parte della curva in cui la fluorescenza aumenta per la prima volta in misura esponenziale rispetto al valore di fondo.

4 Reagenti

4.1 Contenuto della confezione

I reagenti contenuti in una confezione sono sufficienti per 50 determinazioni.

Ogni set di reagenti contiene:

P&P MIX	150 µl di mix di primer e sonde per STD Panel 1 e controllo interno (tappo di colore verde)
ENZYME	600 µl mix di enzimi (tappo di colore bianco) Contiene DNA polimerasi. (Il componente è colorato di blu).
CONTROL INT	250 µl di controllo interno (tappo incolore)
CONTROL +	170 µl di controllo positivo (tappo di colore rosso)
CONTROL -	2 x 1800 µl di controllo negativo (tappo di colore blu)
INSTRU	1 Istruzioni per l'uso

4.2 Reagenti, materiali e dispositivi aggiuntivi richiesti

- MIKROGEN ampliCube Color Compensation per Light Cycler® 480 II (Roche)
- Kit di isolamento degli acidi nucleici reperibile in commercio. Si raccomanda il seguente sistema di estrazione degli acidi nucleici: MagNAPure® Compact, Total Nucleic Acid Kit I (Roche)
- Termociclatore in tempo reale. Si raccomanda il seguente termociclatore: Light Cycler® 480 II (Roche)
- Piastre e pellicole PCR da 96 pozzetti oppure tubi di reazione (PCR-clean), a seconda del termociclatore
- Micropipette con puntali monouso con filtro da 10 µl, 20 µl, 100 µl e 1000 µl
- Miscelatore a vortice
- Mini-centrifuga
- Se necessario, centrifuga per piastre
- Guanti monouso non talcati
- Blocco di raffreddamento

5 Conservazione e manipolazione

- Prima e dopo l'uso conservare i reagenti a una temperatura compresa tra -25°C e -18°C.
- Evitare la ripetizione delle operazioni di congelamento e scongelamento dei componenti (più di dieci volte). Si consiglia di aliquotare i componenti del test dopo il primo scongelamento.
- Durante le fasi di lavoro conservare i reagenti in luogo fresco (+2°C – +8°C).
- Durante l'esecuzione del test proteggere i componenti del kit dalla luce diretta del sole.
- Prima di iniziare il test scongelare completamente tutti i reagenti, miscelarli (brevemente con il miscelatore a vortice) e centrifugarli.
- Sulle confezioni è riportata una data di scadenza, oltre la quale decade la garanzia di qualità del prodotto.
- Il test deve essere eseguito esclusivamente da personale addestrato e autorizzato.
- In caso di modifiche sostanziali al prodotto oppure alle modalità di impiego da parte dell'utente, l'utilizzo può risultare non conforme alla destinazione d'uso stabilita da MIKROGEN.
- La contaminazione incrociata può condurre a risultati errati. Aggiungere con precauzione i campioni del paziente e i controlli, assicurarsi che le miscele di reazione non vengano trasferite in altri pozzetti.

6 Avvertenze e prescrizioni di sicurezza

- Utilizzare solo per la diagnostica in vitro.
- Tutti i campioni del paziente devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo.
- Per l'intera durata dell'esecuzione del test indossare idonei guanti monouso.
- Tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi devono essere trattati con idonee sostanze disinfettanti oppure devono essere smaltiti in conformità con le prescrizioni igieniche applicabili. Osservare le indicazioni del produttore relative alla concentrazione e ai tempi di incubazione.
- Non sostituire né mescolare i reagenti con reagenti di kit di lotti diversi, altri kit PCR MIKROGEN o con reagenti di altri produttori.
- Prima di eseguire il test, leggere e seguire scrupolosamente tutte le istruzioni per l'uso. Eventuali discrepanze con il protocollo di test riportato nelle istruzioni per l'uso possono determinare risultati errati.

7 Prelievo dei campioni e preparazione dei reagenti

7.1 Materiale campione

Il materiale di base per l'ampliCube STD Panel 1 è il DNA, estratto da campioni di urina (di preferenza urina primaria) o tamponi uretrali di origine umana. La qualità della preparazione degli acidi nucleici influenza il risultato del test. È necessario accertarsi che il metodo di estrazione scelto sia compatibile con la tecnologia Real-Time PCR.

7.2 Estrazione degli acidi nucleici

Estrarre gli acidi nucleici dal campione del paziente e dal controllo negativo (NC). Si consiglia un volume iniziale di estrazione di 200 µl e un volume di eluizione di 50 µl. Seguire le istruzioni fornite dal produttore del kit di estrazione.

1. Scongelare il controllo interno (IC) (tappo incolore) e il controllo negativo (NC) (tappo di colore blu).
Assicurarsi che l'IC e il NC siano completamente scongelati. Prima dell'uso miscelare rapidamente l'IC e il NC con il miscelatore a vortice e centrifugare brevemente!
2. Durante l'estrazione di ogni campione del paziente e del NC, aggiungere 5 µl di IC. L'IC deve essere aggiunto alla mix di tamponi di lisi dei campioni e non direttamente al materiale campione. (Nota: l'IC non può essere utilizzato senza estrazione nella PCR!)
3. Estrarre i campioni del paziente e il NC. (Nota: il NC non può essere utilizzato senza estrazione nella PCR!)
4. Il controllo positivo non viene estratto.

Si consiglia il seguente sistema di estrazione degli acidi nucleici, che è stato utilizzato per la valutazione delle prestazioni:

Sistema di estrazione	Volume campione	Volume eluizione
MagNAPure Compact (Roche) Total Nucleic Acid Kit I	200 µl	50 µl

Se si desidera utilizzare altri metodi di estrazione, si prega di rivolgersi al produttore per verificarne la compatibilità.

7.3 Preparazione della Master mix

1. Scongelare la mix di primer e sonde (tappo di colore verde) e la mix di enzimi (tappo di colore bianco). Durante questa operazione proteggere i reagenti dalla luce.
Assicurarsi che i reagenti siano completamente scongelati. Prima dell'uso miscelare i reagenti con il miscelatore a vortice e centrifugare brevemente!
2. Preparare la Master mix attenendosi al seguente schema di pipettaggio:

Componenti	Master mix per 1 reazione
Mix di primer e sonde	3 µl
Mix di enzimi	12 µl
Volume complessivo	15 µl

3. Miscelare tutto la Master mix con il miscelatore a vortice e centrifugare brevemente.
4. Preparare 15 µl di Master mix per ogni reazione PCR.

7.4 Preparazione della reazione PCR

1. Scongelare il controllo positivo (PC) (tappo di colore rosso).
Assicurarsi che i reagenti siano completamente scongelati. Prima dell'uso miscelare i reagenti con il miscelatore a vortice e centrifugare brevemente!

Componenti	1 reazione
Master mix da 7.3	15 µl
Eluato campione o NC oppure il PC	10 µl

2. Pipettare 10 µl di eluato campione nella Master mix.
3. Pipettare 10 µl di controllo positivo (non preparato) nella Master mix.
4. Pipettare 10 µl di eluato del controllo negativo nella Master mix.

Ogni ciclo deve contenere un controllo positivo e uno negativo!
Sigillare la piastra PCR con una pellicola ottica adesiva e chiudere i tubi di reazione con i relativi tappi.



Le piastre PCR e i recipienti di reazione devono essere miscelati nel miscelatore a vortice per almeno 10 secondi al numero di giri massimo e poi centrifugati brevemente.

8 Programmazione del termociclatore in tempo reale

L'ampliCube STD Panel 1 è stato valutato con lo strumento LightCycler® 480 II (Roche).

8.1 Impostazione dei canali di rilevamento

	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria gonorrh.</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	Controllo interno (IC)
Colorante reporter	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Colore	verde	giallo	arancione	rosso
Emissione	510 nm	580 nm	610 nm	660 nm
Quencher	[nessuno]	[nessuno]	[nessuno]	[nessuno]

Per indicazioni sulle lunghezze d'onda dei canali di rilevamento, fare riferimento al LightCycler® 480 II.

In caso d'impiego del LightCycler® 480 II è necessario utilizzare un kit Color Compensation, che può essere richiesto a Mikrogen.

8.2 Programma PCR

Retrotrascrizione	50°C	8 min
Denaturazione	95°C	3 min
Amplificazione	45 cicli	
• Denaturazione	95°C	10 sec
• Annealing/Estensione	60°C	45 sec

Per informazioni di base sulla programmazione dei diversi termociclatori in tempo reale, fare riferimento alle istruzioni del termociclatore in uso. Per informazioni specifiche sulla programmazione dei termociclatori per Real-Time PCR utilizzando l'ampliCube STD Panel 1, contattare il produttore.

9 Risultati

La valutazione dei dati sul LightCycler® 480 II avviene con il metodo *Abs Quant/2nd Derivative Max*.

9.1 Validazione

1. Il controllo negativo deve rimanere al di sotto del *valore soglia (threshold)*. In caso di contaminazione di questo controllo (andamento positivo della curva), il test risulta non valutabile.
2. Il controllo positivo deve mostrare un andamento positivo della curva.
Il valore Ct del controllo positivo deve essere < 33. Un controllo positivo al di fuori di questo intervallo indica un problema nell'amplificazione.
3. Il controllo interno in campioni negativi e nel controllo negativo deve mostrare un andamento positivo della curva. Una discrepanza nell'andamento della curva dell'IC in un campione negativo rispetto al controllo negativo indica un problema nell'estrazione e/o di inibizione della PCR.

9.2 Valutazione

Segnali superiori al *valore soglia* vengono valutati come risultati positivi. I campi vuoti nella tabella sono considerati un risultato negativo.

	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	Controllo interno (IC)
Colore				
verde	positivo			
giallo		positivo		
arancione			positivo	
rosso				positivo*

* In caso di segnale positivo nei canali di rilevamento degli agenti patogeni, il segnale del controllo interno non è necessario per l'interpretazione del test. Un elevato carico di patogeni nel campione del paziente può condurre a un segnale minore o inesistente per il controllo interno.

10 Limiti del metodo, limitazioni

- I risultati dei test devono essere sempre considerati nel contesto del quadro clinico del paziente. Le conseguenze terapeutiche dei rilevamenti devono essere determinate in considerazione dei dati clinici.
- Un risultato negativo del test *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e/o *Mycoplasma genitalium* non può escludere un'infezione dai rispettivi agenti patogeni.

11 Caratteristiche delle prestazioni

11.1 Sensibilità e specificità diagnostica

La sensibilità e la specificità sono state determinate sulla base di campioni di pazienti definiti positivi e negativi.

Tabella 1: Campioni definiti positivi

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
Sensibilità	100%	100%	100%

Tabella 2: Campioni definiti negativi

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
Specificità	100%	100%	100%

11.2 Sensibilità analitica

Il limite di rilevabilità (LoD) dell'ampliCube STD Panel 1 è stato determinato con una serie di diluizioni a concentrazioni note del DNA plasmidico su un sistema LightCycler® 480 II (Roche). Il limite di rilevabilità del 95% è stato definito mediante analisi probit con il software CombiStats™ versione 5.0 (Consiglio d'Europa).

Tabella 3: Limite di rilevabilità (LoD)

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

11.3 Specificità analitica

La ricerca in BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) mostra che le sonde e i primer selezionati dell'ampliCube STD Panel 1 rilevano in modo specifico gli agenti patogeni selezionati.

È stata inoltre determinata la specificità attraverso l'esame del DNA/RNA genomico di ulteriori batteri e virus patogeni per l'uomo.

Tabella 4: Batteri e virus testati per mostrare la specificità analitica dell'ampliCube STD Panel 1.

Batteri	Virus
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Adenovirus A
<i>Bordetella pertussis</i>	Adenovirus di sierotipo 1 (C)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Adenovirus di sierotipo 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+	Citomegalovirus
EIEC	Enterovirus 68
<i>Enterococcus faecalis</i>	Virus di Epstein-Barr
ETEC	Virus dell'herpes simplex 1
<i>Haemophilus influenzae</i>	Virus dell'herpes simplex 2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Metapneumovirus umano A
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Virus dell'influenza A
<i>Legionella pneumophila</i>	Virus dell'influenza B
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Virus del morbillo
<i>Morganella morganii</i>	Parotite
<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 della varicella zoster

Nessuno di questi campioni ha mostrato un segnale positivo. Le sonde e i primer utilizzati nell'ampliCube STD Panel 1 non hanno mostrato reazioni crociate con gli agenti patogeni elencati in Tabella 4. Il controllo interno (IC) è stato valido in tutti i test.

12 Riferimenti bibliografici

- 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. Gonorrhea - 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

Su richiesta saremo lieti di inviarvi ulteriore documentazione.

13 Spiegazione dei simboli

	Contiene reattivi sufficienti per <n> determinazioni Numero degli inserimenti
	Mix di primer e sonde
	Mix di enzimi
	Controllo interno
	Controllo positivo
	Controllo negativo
	Istruzioni per l'uso
	Osservare le istruzioni per l'uso
	Contenuto, contiene
	Test in vitro
	Numero di lotto/versione
	Numero di catalogo
	Utilizzare entro Data di scadenza
	Conservare a una temperatura compresa tra x°C e y°C
	Produttore

14 Dati sul produttore e sulla versione

ampliCube STD Panel 1	Articolo n° 50301
Istruzioni per l'uso valido da	GAACSD1003IT 2023-04
	MIKROGEN GmbH Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Germania Tel. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-mail mikrogen@mikrogen.de Internet www.mikrogen.de

