

**IVD**

Instrucciones de uso (español)

**1 Uso previsto**

La batería de análisis ampliCube STD Panel 2.1 LC es una prueba *in vitro*, cualitativa, para la identificación específica de ADN de *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Ureaplasma parvum* (y su diferenciación) en muestras de orina (preferiblemente orina de la primera micción) o de frotis urogenitales de origen humano.

Solo para uso en un LightCycler® 480 Instrument II (Roche). Esta prueba no está ideada para su uso en otros termocicladores de PCR en tiempo real.

**2 Campo de aplicación**

*Trichomonas vaginalis* es un protozoo anaerobio, parasitario, que pertenece a la familia de los tricomonas y se transmite principalmente por contacto sexual. En la mayoría de los casos, la enfermedad en los hombres no presenta síntomas, pero puede causar una uretritis. Los síntomas en la mujer se manifiestan con inflamaciones de las mucosas en los órganos sexuales (colpitis por tricomona). En este caso también puede presentarse una infestación de la uretra que causa una inflamación.

Las bacterias *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Ureaplasma parvum* pertenecen a la familia de las micoplasmatáceas. La infección por micoplasmatáceas es una enfermedad altamente contagiosa que se presenta frecuentemente por contacto sexual. Los agentes patógenos se anidan a menudo en la zona genital sin dañar el huésped; sin embargo, pueden causar ocasionalmente inflamaciones locales. Los síntomas son diferentes, dependiendo del lugar de la inflamación (uréter, vejiga, próstata, riñones, pelvis renal, vagina, trompas de Falopio, ovarios). Los síntomas más frecuentes son poliuria, ardor al orinar, secreción amarillenta (uretritis) y dolores en la zona renal. En el varón, *U. urealyticum* es el agente patógeno de la uretritis y la prostatitis no gonorreicas.

**3 Principio de la prueba**

La prueba es un sistema de PCR 'Real Time' (en tiempo real). Utiliza primers (cebadores) específicos y sondas marcadas para la amplificación y detección del ADN de *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Ureaplasma parvum*.

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

Las sondas para la detección específica del agente patógeno del ADN están marcadas con el colorante reportero FAM (*Trichomonas vaginalis*), HEX (*Mycoplasma hominis*), ATTO Rho12 (*Ureaplasma urealyticum/parvum*) y Cyan 500 (*Ureaplasma parvum*), y las sondas para la detección del control interno con ATTO 647N. Esto permite la detección simultánea de todas las secuencias destinatarias en una mezcla de reacción.

El valor de Ct (*cycle threshold*, umbral del ciclo) describe la parte de la curva en la que la fluorescencia aumenta por primera vez exponencialmente, sobrepasando el valor de fondo.

**4 Reactivos**

**4.1 Contenido del envase**

Un envase contiene reactivos suficientes para 50 determinaciones. Cada kit de reactivos contiene:

<b>P&amp;P MIX</b>	150 µl de mezcla de Primer & Probe (cebador y sonda) para <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Ureaplasma parvum</i> y control interno (tapón verde)
<b>ENZYME</b>	600 µl de mezcla de enzimas (tapón blanco) Contiene ADN polimerasa. (El componente está coloreado de azul.)
<b>CONTROL INT</b>	250 µl de control interno (tapón incoloro)

<b>CONTROL +</b>	170 µl de control positivo (tapón rojo)
<b>CONTROL -</b>	2x 1800 µl de control negativo (tapón azul)
<b>INSTRU</b>	1 Instrucciones de uso

**4.2 Otros reactivos, materiales y aparatos necesarios**

- ampliCube Color Compensation de MIKROGEN (LightCycler® 480, 5-Plex, ref. 50502)
- Extracción de ácidos nucleicos: Se recomiendan los siguientes sistemas de extracción de ácidos nucleicos: MagNA Pure® System, Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche) o alphaClean Mag RNA/DNA Kit (MIKROGEN) con procesamiento en el extractor M32, M48 o M96(Biocomma)
- Termociclador en tiempo real: LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Placas de PCR de 96 pocillos y portaobjetos: siga las recomendaciones del fabricante del termociclador de PCR en tiempo real.
- Micropipetas con puntas desechables y filtros de 10 µl, 20 µl, 100 µl y 1000 µl
- Mezclador vorticial de alta velocidad (recomendado: 3200 rev/min).
- Minicentrífugadora
- Centrífugadora de placas
- Guantes protectores desechables sin talco
- Bloque de refrigeración

**5 Vida útil y manipulación**

- Conserve los reactivos antes y después de su uso a una temperatura 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 alicuotado de los componentes de la prueba después de la primera descongelación.
- Durante los pasos de trabajo, los reactivos deben mantenerse siempre refrigerados a una temperatura adecuada (+2 °C a +8 °C).
- Proteger los componentes del kit contra la luz solar directa, durante toda la ejecución de la prueba.
- Antes de empezar la prueba, todos los reactivos se deben descongelar completamente, mezclar (brevemente con la agitadora vorticial) y centrifugar.
- Los envases llevan una fecha de caducidad, a partir de la cual ya no se concederá ninguna garantía de calidad.
- La prueba la debe llevar a cabo exclusivamente personal especializado debidamente formado y autorizado.
- Si el usuario ha llevado a cabo modificaciones sustanciales del producto o de las instrucciones de uso, es posible que la aplicación ya no cumpla el propósito especificado por MIKROGEN.
- Una contaminación cruzada puede producir resultados incorrectos de la prueba. Añada cuidadosamente las muestras de los pacientes y los controles. Evite arrastrar las mezclas de reactivos a otros pocillos.

**6 Advertencias y medidas de seguridad**

- Utilizar el producto exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.
- Todas las muestras de pacientes deben manipularse 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 muestras potencialmente infecciosas se deben tratar con desinfectantes adecuados o eliminar de acuerdo con las normas de higiene. Se deben observar las concentraciones y los tiempos de incubación especificados por los fabricantes.
- 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.
- Lea detenidamente y observe las instrucciones de uso completas, antes de iniciar la prueba. Las desviaciones del protocolo de análisis indicado en las instrucciones de uso puede producir resultados incorrectos.

## 7 Toma de muestras y preparación de los reactivos

### 7.1 Material y preparación de las muestras

El material inicial para el ampliCube STD Panel 2.1 LC es ADN extraído de muestras de orina (preferiblemente la orina de la primera micción) o de frotis urogenitales de origen humano. La calidad de la preparación del ácido nucleico influye en el resultado de la prueba. Es necesario garantizar que el método de extracción elegido sea compatible con la tecnología de RCP en tiempo real.

### 7.2 Extracción de ácidos nucleicos

Extraiga ácidos nucleicos de la muestra 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 o 100 µl, según el sistema de extracción. Observe las instrucciones del fabricante del kit de extracción.

- Descongele el control interno (IC) (tapón incoloro) y el control negativo (NC) (tapón azul).  
**Asegúrese de que el IC y el NC estén completamente descongelados. Antes del uso, mezcle el IC y el NC con la agitadora vorticial y centrifúguelos brevemente.**
- Durante la extracción, agregue a cada muestra del paciente y al NC 5 µl de IC. El IC debe agregarse a la mezcla de tampón de lisis y muestra y no directamente al material de muestra.
- Extraiga las muestras del paciente y el NC. (Nota: No se puede introducir el NC en la RCP sin llevar a cabo la extracción.)
- El control positivo no se extrae.

Se utilizaron los siguientes sistemas de extracción de ácidos nucleicos para evaluar el rendimiento:

Sistema de extracción	Volumen de muestra	Volumen de elución
MagNA Pure® 24 (Roche) Total NA Isolation Kit	200 µl	50 µl
M96 Nucleic Acid Extraction Systems (biocomma) alphaClean Mag RNA/DNA Kit (MIKROGEN)	200 µl	100 µl
M32 Nucleic Acid Extraction Systems (biocomma) alphaClean Mag RNA/DNA Kit (MIKROGEN)	200 µl	100 µl

Si desea utilizar métodos de extracción distintos a los enumerados en 4.2 y para la evaluación del rendimiento, consulte previamente al fabricante para aclarar la compatibilidad.

### 7.3 Preparación de la mezcla maestra

- Descongele la mezcla de Primer & Probe (tapón verde) y la mezcla de enzimas (tapón blanco). Proteja los reactivos de la luz.  
**Asegurarse que los reactivos estén completamente descongelados. Antes del uso, mezcle los reactivos con la agitadora vorticial y centrifúguelos brevemente.**
- Prepare la mezcla maestra de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

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

- Mezcle la mezcla maestra con la agitadora vorticial y centrifúguela brevemente.
- Prepare 15 µl de mezcla maestra para cada reacción de RCP.

### 7.4 Preparación de la reacción de RCP

- Descongele el control positivo (PC) (tapón rojo).  
**Asegurarse que los reactivos estén completamente descongelados. Antes del uso, mezcle los reactivos con la agitadora vorticial y luego centrifúguelos durante un breve tiempo.**

Componente	1 reacción
Mezcla maestra de 7.3	15 µl
Eluido de muestra o eluido de NC o PC	10 µl

- Pipetee 10 µl de eluido de muestra en 15 µl de mezcla maestra.
- Pipetee 10 µl de control positivo (no preparado) en 15 µl de mezcla maestra.
- Pipetee 10 µl de eluido del control negativo en 15 µl de mezcla maestra.

Cada ciclo debe incluir un control positivo y uno negativo.

Selle la placa de RCP con una lámina óptica adhesiva.



Las placas de RCP se deben agitar en vórtice a máxima velocidad durante al menos 5 segundos y luego se deben centrifugar brevemente.

## 8 Programación del termociclador en tiempo real

Se evaluó el ampliCube STD Panel 2.1 LC con el LightCycler® 480 Instrument II (Roche) y solo se desarrolló para su procesamiento en un LightCycler® 480 Instrument II (Roche).

### 8.1 Ajuste de los canales de detección

	<i>Ureaplasma parvum</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Control interno (IC)
Color	azul	verde	amarillo	naranja	rojo
Colorante reportero	Cyan 500	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Excitación	440 nm	465 nm	533 nm	533 nm	618 nm
Emisión	488 nm	510 nm	580 nm	610 nm	660 nm
Extintor	[ninguno]	[ninguno]	[ninguno]	[ninguno]	[ninguno]

Las indicaciones relativas a las longitudes de onda de los canales de detección se refieren al LightCycler® 480 Instrument II (Roche). Para el LightCycler® 480 Instrument II (Roche) es necesario utilizar previamente una compensación de color (5-Plex, ref. 50502), provista por MIKROGEN.

### 8.2 Programa de RCP

Transcripción inversa	50°C	8 min.
Desnaturalización	95°C	3 min.
<b>Amplificación</b>	<b>45 ciclos</b>	
• Desnaturalización	95°C	10 s
• Hibridación/elongación	60°C	45 s

Encontrará información básica sobre la programación del LightCycler® 480 Instrument II (Roche) en el manual de instrucciones del termociclador. Para informaciones específicas sobre la programación del termociclador de PCR en tiempo real utilizando el ampliCube STD Panel 2.1 LC, sírvase contactar al fabricante.

## 9 Resultados

### 9.1 Validación

- El control negativo debe encontrarse debajo del *threshold* (umbral). El control interno (IC) en el control negativo debe mostrar una curva positiva. Si el control negativo muestra una curva positiva (contaminación) o si el IC en el control negativo no es válido, no se podrá evaluar la prueba.
- El control positivo debe presentar una curva positiva. El valor de Ct del control positivo debe ser < 33. Un control positivo fuera de este intervalo indica un problema con la amplificación.
- El control interno (IC) de muestras negativas debe mostrar una curva positiva.  
Es necesario comparar la señal del IC de una muestra del paciente con la señal del IC en el control negativo extraído. Una diferencia de > +3 en el valor de Ct de la IC de una muestra en comparación con la IC del control negativo o bien la ausencia de la señal del IC en la muestra puede indicar que hay una inhibición significativa de la reacción de PCR. En estos casos, no es válido un resultado negativo de la prueba.

### 9.2 Evaluación

La evaluación de los datos puede llevarse a cabo con el correspondiente software de termociclador RCP o con una solución de software admitida específicamente por MIKROGEN para la evaluación automatizada de la RCP. Si se utiliza un LightCycler® 480 Instrument II (Roche), se puede efectuar la validación con el método *Abs Quant/2nd Derivative Max* (recomendado) o el método *Abs Quant/Fit Points*. Solicite a MIKROGEN más información e instrucciones correspondientes.

Las señales de amplificación de un valor superior al *threshold* (umbral) se consideran resultados positivos. Los campos vacíos de tabla se valoran como resultado negativo.

Color	<i>Ureaplasma parvum</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Control interno (IC)
azul	positivo				
verde		positivo			
amarillo			positivo		
naranja				positivo	
rojo					positivo

\* Si los canales de detección del patógeno presentan señales positivas, no se requiere la señal del control interno para interpretar la prueba. Una muestra del paciente con gran carga de patógenos puede producir una disminución de la señal o una ausencia de señal para el control interno.

## 10 Límites del método, restricciones

- Los resultados de la prueba deben contemplarse siempre en relación con el cuadro clínico. Las consecuencias terapéuticas del hallazgo deben contemplarse en relación con los datos clínicos.
- Un resultado negativo del resultado de la prueba de *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* o *Ureaplasma parvum* no significa que se pueda descartar una infección por el respectivo agente patógeno.

## 11 Características del rendimiento

### 11.1 Sensibilidad y especificidad diagnósticas

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

Tabla 1. Muestras clínicas definidas como positivas.

ampliCube STD Panel 2.1 LC	<i>Trichomonas vaginalis</i> (n=33)	<i>Mycoplasma hominis</i> (n = 5)	<i>Ureaplasma urealyticum</i> (n = 6)	<i>Ureaplasma parvum</i> (n = 19)
Negativo	0	0	0	0
Positivo	33	5	6	19
<b>Sensibilidad [%]</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
95% CI* [%]	89,57 – 100	56,55 – 100	60,97 – 100	83,18 – 100

\* CI = intervalo de confianza (ingl. *confidence interval*)

Tabla 2. Muestras clínicas definidas como negativas.

ampliCube STD Panel 2.1LC	<i>Trichomonas vaginalis</i> (n=66)	<i>Mycoplasma hominis</i> (n = 66)	<i>Ureaplasma urealyticum</i> (n = 66)	<i>Ureaplasma parvum</i> (n = 66)
Negativo	66	66	66	66
Positivo	0	0	0	0
<b>Especificidad [%]</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
95% CI* [%]	94,50 – 100	94,50 – 100	94,50 – 100	94,50 – 100

\* CI = intervalo de confianza (ingl. *confidence interval*)

### 11.2 Sensibilidad analítica

Se determinó el límite de comprobación (LoD) de ampliCube STD Panel 2.1 LC mediante diluciones seriadas de ADN genómico purificado (Vircell Standard) de concentración conocida en el LightCycler® 480 Instrument II (Roche). Se determinó el límite de detección del 95 % mediante un análisis de regresión Probit con el software CombiStats™ versión 6.0 (Consejo Europeo).

Tabla 3: Límite de detección (LoD)

	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>
<b>LoD</b> Límite de detección del 95% [copias/PCR]	6,41	15,50	5,64	8,90
<b>95% CI*</b> [copias/PCR]	2,90 – 25,28	9,53 – 37,67	3,28 – 18,69	4,80 – 27,51

\* CI = intervalo de confianza (ingl. *confidence interval*)

### 11.3 Especificidad analítica

La búsqueda BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)) indica que los cebadores y las sondas seleccionados del ampliCube STD Panel 2.1 LC detectan específicamente los patógenos seleccionados.

Además, se determinó la especificidad mediante el estudio de los ADN/ARN genómicos de otras bacterias y virus patógenos para el ser humano.

Tabla 4. Bacterias y virus analizados para indicar la especificidad analítica de ampliCube STD Panel 2.1 LC.

Bacterias	Virus
<i>Aerococcus urinae</i>	Adenovirus
<i>Campylobacter coli</i>	Citomegalovirus
<i>Campylobacter jejuni</i>	Virus de herpes simple 1
<i>Candida albicans</i>	Virus de herpes simple 2
<i>Candida glabrata</i>	Virus de las paperas
<i>Candida krusei</i>	Virus varicela zóster
<i>Candida parapsilosis</i>	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	
<i>Citrobacter freundii</i>	
<i>Clostridium difficile</i>	
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>E. coli</i> enterohemorrágica stx+	
<i>Enterococcus faecalis</i>	
<i>Mycoplasma genitalium</i>	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Proteus vulgaris</i>	
<i>Providencia stuarti</i>	
<i>Treponema pallidum</i>	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	

Ninguna de estas muestras presentó una señal positiva. Los cebadores y sondas utilizados en el ampliCube STD Panel 2.1 LC no mostraron reacción una cruzada alguna con los agentes patógenos indicados en la tabla 4. El control interno (IC) era válido en todos los análisis.

### 11.4 Equivalencia de diferentes materiales de muestra

Se determinó el coeficiente de variación (CV) del valor de Ct entre el agua y el extracto del material de muestra correspondiente después de añadir una concentración conocida de ADN genómico y purificado (Vircell Standard).

Tabla 5. Equivalencia de diferentes materiales de muestra

	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>
CV [%] (orina, H <sub>2</sub> O)	0,57	0,95	1,24	0,75
CV [%] (frotis, H <sub>2</sub> O)	0,73	1,11	1,32	0,81

El coeficiente de variación (CV), basado en el valor Ct (*cycle threshold*, umbral del ciclo) entre el agua y los extractos de ADN (obtenidos de los diferentes materiales de muestra), fue  $\leq 1,32\%$  en todos los genes destinatarios.

## 12 Bibliografía

- M. Biernat-Sudolska et al. (2006): Assessment of various diagnostic methods of ureaplasma respiratory tract infections in newborns. Acta Biochimica Polonica, October 2006; Vol 53 No.3/2006 pp: 609-612
- M. Bradic et al (2017): Genetic indicators of drug resistance in the highly repetitive genomes of *Trichomonas vaginalis* and other trichomonads. Genome Biol Evol. 2017 Jun; 9(6): pp: 1658–1672
- R. L Dunne et al (2003): Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. Cell Research (2003); 13(4): pp: 239-249
- T. Edwards et al (2014): *Trichomonas vaginalis*: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. Crit Rev Microbiol, Early Online: 1–12
- M. Hobbs et al (2013): Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection.
- C. Huang et al (2015): *Mycoplasma* and *ureaplasma* infection and male infertility: a systematic review and meta-analysis, Andrology 3.5, pp: 809-816
- R. D. Kirkcaldy et al (2012): *Trichomonas vaginalis* Antimicrobial Drug Resistance in 6 US Cities, STD Surveillance Network, 2009–2010. Emerging Infectious Diseases Vol. 18, No. 6, June 2012, pp: 939-943
- B. Larsen et al (2010): *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and Adverse Pregnancy Outcomes: A Fresh Look. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology, Volume 2010, Article ID 521921, pp: 1-7
- H. Moi et al (2015): Management of non-gonococcal urethritis, BMC infectious diseases 15.1, pp: 1-7

10. T. E. Paulish-Miller et al (2014): *Trichomonas vaginalis* Metronidazole Resistance Is Associated with
11. Sex Transm Infect. 2013 September; 89(6): pp: 434–438
12. Single Nucleotide Polymorphisms in the Nitroreductase Genes *ntf4Tv* and *ntf6Tv*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy p. 2938–2943 May 2014 Volume 58 Number 5
13. J. R. Schwebke et al (2004): Trichomoniasis. Clinical Microbiology Reviews, Oct. 2004, pp. 794–803
14. D. Shey Nsagha et al (2015): The Epidemiology of *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* and *Candida albicans* Co- Infections in Women Attending the Yaounde University Teaching Hospital. American Journal of Epidemiology and Infectious Disease, 2015, Vol. 3, No. 2, pp: 28-31

Con mucho gusto le enviaremos bibliografía más detallada, previa solicitud.

### 13 Explicación de los símbolos

	Contenido suficiente para <n> análisis Cantidad de preparaciones
<b>P&amp;P MIX</b>	Mezcla de Primer & Probe
<b>ENZYME</b>	Mezcla de enzimas
<b>CONTROL INT</b>	Control interno
<b>CONTROL +</b>	Control positivo
<b>CONTROL -</b>	Control negativo
<b>INSTRU</b>	Instrucciones de uso
	Observar las instrucciones de uso
<b>CONT</b>	Contenido, contiene
<b>IVD</b>	Productos para diagnóstico <i>in vitro</i>
<b>LOT</b>	Número de lote/versión
<b>REF</b>	Número de pedido
	Fecha de caducidad Fecha de vencimiento
	Conservación entre x °C y y °C
	Fabricante

### 14 Datos del fabricante y de la versión

<b>ampliCube STD Panel 2.1 LC</b>		Ref. 50312
Instrucciones de uso válidas a partir de		GAACSD21L2ES 2023-04
	<b>MIKROGEN GmbH</b> 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	
		<b>CE</b>



GAACSD21L2