

IVD

Gebrauchsanweisung (Deutsch)

1 Zweckbestimmung

Der ampliCube STD Panel 3 ist ein qualitativer In-vitro-Test zum spezifischen Nachweis der DNA von Herpes Simplex Virus (Typ 1/2) und *Treponema pallidum* in Urogenitalabstrichen humanen Ursprungs.

2 Anwendungsbereich

Das Herpes Simplex Virus wie auch das Bakterium *Treponema pallidum* können genitale Ulcera (Geschwüre) hervorrufen. Die Herpes Simplex Virustypen (HSV-1, HSV-2) können sowohl den Lippen- als auch den Genitalherpes verursachen. Durch engen Schleimhautkontakt werden die Viren über die äußerst ansteckende Flüssigkeit der Herpesbläschen übertragen. Herpes in der Mund-Lippenregion wird meist von HSV-1 ausgelöst. In der Geschlechts- und Analregion ist es zu 80 Prozent das Herpes Simplex Virus 2 (HSV-2) und zu 20 Prozent HSV-1. Weltweit sind Herpesviren die häufigste Ursache für genitale Ulcera bei beiden Geschlechtern. *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* ist der Erreger der Syphilis oder Lues und gehört zur Familie der Spirochäten. Die Übertragung findet durch direkten Kontakt der Schleimhäute beim Geschlechtsverkehr statt. In dem vom Ulcus durum, dem Primäraffekt der Syphilis abgesonderten Sekret ist das Bakterium in großer Anzahl nachweisbar. Dem DNA-Nachweis kommt eine große Bedeutung zu, da der Erreger bisher nicht anzüchtbar ist.

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 Herpes Simplex Virus (Typ 1/2) und *Treponema pallidum*. 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 den Reporter-Farbstoffen FAM (Herpes Simplex Virus) und HEX (*Treponema pallidum*), 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 3 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).
- Kittkomponenten 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 substantziellen 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 3 ist DNA, extrahiert aus Urogenitalabstrichen 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 3 wurde mit dem LightCycler® 480 Instrument II (Roche) evaluiert.

8.1 Einstellung der Detektionskanäle

	Herpes Simplex Virus (Typ 1/2)	Treponema pallidum	Interne Kontrolle (IC)
Reporterfarbstoff	FAM	HEX	ATTO 647N
Farbe	grün	gelb	rot
Emission	510 nm	580 nm	660 nm
Quencher	[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 3 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.

	Herpes Simplex Virus (Typ 1/2)	Treponema pallidum	Interne Kontrolle (IC)
Farbe			
grün	positiv		
gelb		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 Herpes Simplex Virus und/oder *Treponema pallidum* 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 3	Herpes Simplex Virus (Typ 1/2) (n=19)	Treponema pallidum (n=10)
Negativ	0	0
Positiv	19	10
Sensitivität	100%	100%

Tabelle 2: Definiert negative Proben

ampliCube STD Panel 3	Herpes Simplex Virus (Typ 1/2) (n=10)	Treponema pallidum (n=10)
Negativ	10	10
Positiv	0	0
Spezifität	100%	100%

11.2 Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze (LoD) des ampliCube STD Panel 3 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)

	Herpes Simplex Virus (Typ 1/2)	Treponema pallidum
LoD	11,92	7,16
95%-Detektionslimit Genome/PCR	(6,26 – 32,33)	(4,23 – 16,51)

11.3 Analytische Spezifität

Die BLAST Suche (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) zeigt, dass die ausgewählten Primer und Sonden des ampliCube STD Panel 3 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 3 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>Chlamydia trachomatis</i>	Coronavirus 229E
<i>Citrobacter freundii</i>	Coronavirus NL63
<i>Clostridium difficile</i>	Coronavirus OC43
<i>Clostridium perfringens</i>	Cytomegalovirus
EHEC stx+	Enterovirus 68
EIEC/Shigella	Epstein-Barr Virus
<i>Enterococcus faecalis</i>	Human Metapneumovirus A
ETEC	Influenza A virus
<i>Haemophilus influenzae</i>	Influenza B virus
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Measles virus
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Mumps virus
<i>Legionella pneumophila</i>	Norovirus G1
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Norovirus G2
<i>Morganella morganii</i>	Parainfluenza 1
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Parvovirus B19
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Respiratory syncytial virus A
<i>Neisseria cinerea</i>	Respiratory syncytial virus B
<i>Neisseria gonorrhoe</i>	Rotavirus
<i>Proteus mirabilis</i>	Varicella zoster virus
<i>Proteus vulgaris</i>	
<i>Salmonella typhimurium</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	

Keine dieser Proben zeigte ein positives Signal. Die im ampliCube STD Panel 3 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

1. RKI (2016): Weiterer verstärkter Anstieg von Syphilis-Infektionen bei Männern, die Sex mit Männern haben. Epidemiologisches Bulletin 19. Dezember 2016 / Nr. 50, pp: 547-560
2. P. French (2007): Syphilis. BMJ 2007; 334:143-7
3. Linda Grillova et al (2014): Molecular Typing of *Treponema pallidum* in the Czech Republic during 2011 to 2013: Increased Prevalence of Identified Genotypes and of Isolates with Macrolide Resistance.
4. Journal of Clinical Microbiology October 2014 Volume 52 Number 10 pp. 3693–3700
5. E. W. Hook (2016): Syphilis. the lancet Vol 389 April 15, 2017
6. D. Jaishankar et al (2016): Genital Herpes: Insights into Sexually Transmitted Infectious Disease. Microbial Cell, September 2016 Vol. 3 No. 9 pp: 438-450
7. C. Johnston et al (2016): Current Concepts for Genital Herpes Simplex Virus Infection: Diagnostics and Pathogenesis of Genital Tract Shedding. Clinical Microbiology Reviews: January 2016 Volume 29 Number 1 pp: 149-161
8. V. Lee et al (2008): Syphilis: an update. Clinical Medicine Vol 8 No 3 June 2008 pp: 330-333
9. J. Le Goff et al (2014): Diagnosis of genital herpes simplex virus. infection in the clinical laboratory. Virology Journal 2014, 11:83#
10. J. Radolf et al (2016): *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete: making a living as a stealth pathogen. Nat Rev Microbiol. 2016 December 14(12): 744–759.
11. L.V. Stamm (2016): Syphilis: Re-emergence of an old foe. Microbial Cell September 2016 Vol. 3 No. 9 pp: 363-370

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 3		Artikel-Nr. 50303
Gebrauchsanweisung gültig ab		GAACSD3002D 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



GAACSD3002