

IVD

Instrucciones de uso (español)

1 Uso previsto

El ampliCube STD Panel 3 es un test de calidad in vitro usado para la comprobación específica del ADN del virus herpes simplex (tipos 1/2) y *treponema pallidum* en frotis urogenitales de origen humano.

2 Campo de aplicación

El virus herpes simplex como también la bacteria *treponema pallidum* pueden causar úlcera genital (forúnculos). Los virus del tipo herpes simplex (HSV-1, HSV-2) pueden causar tanto el herpes labial como el herpes genital. Debido al contacto directo de las mucosas, estos virus se transmiten a través del líquido extremadamente infeccioso de las ampollas de herpes. La causa de la mayoría de los herpes de la región bucal/labial es el HSV-1. En el 80 por ciento del herpes en la región genital/anal se trata del virus herpes simplex 2 (HSV-2) y en el 20 por ciento se trata del HSV-1. A nivel mundial, los virus del herpes son la causa más frecuente de las úlceras genitales en ambos sexos.

El *treponema pallidum* subesp. *pallidum* es el agente patógeno de la sífilis o lúes y pertenece a la familia de las espiroquetas. La transmisión tiene lugar por el contacto directo de las mucosas durante el acto sexual. La bacteria se comprueba en gran cantidad en la sustancia secretada por el chancro duro, la afección primaria de la sífilis. La comprobación del ADN es muy importante porque hasta ahora ha sido imposible cultivar este agente patógeno.

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 virus herpes simplex (tipo 1/2) y *treponema pallidum*.

Para asegurar que los ácidos nucleicos aislados de la prueba del paciente no contengan sustancias inhibitoras de la PCR, se somete a 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 (virus herpes simplex) y HEX (*treponema pallidum*) 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 3 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 3 es el ADN extraído de frotis urogenitales 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 3 se evaluó con el LightCycler® 480 Instrument II (Roche).

8.1 Ajuste de los canales de detección

	Virus herpes simplex (tipo 1/2)	Treponema pallidum	Control interno (IC)
Colorante reportero	FAM	HEX	ATTO 647N
Color	verde	amarillo	rojo
Emisión	510 nm	580 nm	660 nm
Extintor	[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 3 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.

	Virus herpes simplex (tipo 1/2)	Treponema pallidum	Control interno (IC)
Color			
verde	positivo		
amarillo		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 del test del virus herpes simplex y/o *Treponema pallidum* 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 3	Virus herpes simplex (tipo 1/2) (n=19)	Treponema pallidum (n=10)
Negativo	0	0
Positivo	19	10
Sensibilidad	100%	100%

Tabla 2: Define pruebas negativas

ampliCube STD Panel 3	Virus herpes simplex (tipo 1/2) (n=10)	Treponema pallidum (n=10)
Negativo	10	10
Positivo	0	0
Especificidad	100%	100%

11.2 Sensibilidad analítica

El límite de comprobación (LoD) del ampliCube STD Panel 3 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)

	Virus herpes simplex (tipo 1/2)	Treponema pallidum
LoD		
Límite de detección de 95% Genomio/PCR	11,92 (6,26 – 32,33)	7,16 (4,23 – 16,51)

11.3 Especificidad analítica

La búsqueda BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) indica que los primers y sondas seleccionados del ampliCube STD Panel 3 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 3.

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>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	Virus Epstein-Barr
<i>Enterococcus faecalis</i>	Metapneumovirus A humano
ETEC	Virus influenza A
<i>Haemophilus influenzae</i>	Virus influenza B
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Virus Measles
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Virus de paperas
<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>	Virus respiratorio sincitial A
<i>Neisseria cinerea</i>	Virus respiratorio sincitial B
<i>Neisseria gonorrhoe</i>	Rotavirus
<i>Proteus mirabilis</i>	Virus de la varicella-zoster
<i>Proteus vulgaris</i>	
<i>Salmonella typhimurium</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	

Ninguna de estas pruebas presentó una señal positiva. Los primers y sondas utilizados en el ampliCube STD Panel 3 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

- P. French (2007): Syphilis. BMJ 2007; 334:143-7
- 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.
- Journal of Clinical Microbiology October 2014 Volume 52 Number 10 pp. 3693-3700
- E. W. Hook (2016): Syphilis. the lancet Vol 389 April 15, 2017
- D. Jaishankar et al (2016): Genital Herpes: Insights into Sexually Transmitted Infectious Disease. Microbial Cell, September 2016 Vol. 3 No. 9 pp: 438-450
- 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
- V. Lee et al (2008): Syphilis: an update. Clinical Medicine Vol 8 No 3 June 2008 pp: 330-333
- J. Le Goff et al (2014): Diagnosis of genital herpes simplex virus. infection in the clinical laboratory. Virology Journal 2014, 11:83#
- 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.
- L.V. Stamm (2016): Syphilis: Re-emergence of an old foe. Microbial Cell September 2016 Vol. 3 No. 9 pp: 363-370

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 3	Nº de artículo 50303
Instrucciones de uso válido a partir de	GAACSD3002ES 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



GAACSD3002