

**IVD**

## Istruzioni per l'uso (italiano)

### 1 Destinazione d'uso

L'ampliCube STD Panel 3 è un test qualitativo in vitro per il rilevamento specifico del DNA del virus dell'Herpes Simplex (tipo 1/2) e di *Treponema pallidum* in tamponi urogenitali di origine umana.

### 2 Campo d'applicazione

Il virus dell'Herpes Simplex, così come il batterio *Treponema pallidum*, possono provocare ulcere genitali.

Le due tipologie del virus dell'Herpes Simplex (HSV-1, HSV-2) possono causare sia l'herpes labiale che quello genitale. Il contatto intimo tra mucose determina la trasmissione del virus attraverso il liquido estremamente infettivo contenuto nelle vescicole erpetiche. La maggior parte dei casi di herpes nella regione oro-labiale viene provocato dall'HSV-1. Nella regione ano-genitale, si tratta per l'80 per cento del virus dell'Herpes Simplex 2 (HSV-2) e per il 20 per cento dell'HSV-1. I virus erpeticici sono la causa più comune di ulcere genitali per entrambi i sessi in tutto il mondo.

Il *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* è l'agente eziologico della sifilide, o lue, e appartiene alla famiglia delle spirochete. La trasmissione ha luogo per contatto diretto delle mucose durante il rapporto sessuale. Il batterio è rilevabile in gran numero nel secreto prodotto dall'ulcera dura, o sifiloma, l'effetto primario della sifilide. Il rilevamento del DNA assume una grande importanza in quanto, fino ad oggi, l'agente eziologico non è coltivabile.

### 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 del virus dell'Herpes Simplex (tipo 1/2) e di *Treponema pallidum*.

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 (virus dell'Herpes Simplex) e HEX (*Treponema pallidum*), 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:

<b>P&amp;P MIX</b>	150 µl di mix di primer e sonde per STD Panel 3 e controllo interno ( <b>tappo di colore verde</b> )
<b>ENZYME</b>	600 µl mix di enzimi ( <b>tappo di colore bianco</b> ) Contiene DNA polimerasi. ( <b>Il componente è colorato di blu</b> ).
<b>CONTROL INT</b>	250 µl di controllo interno ( <b>tappo incolore</b> )
<b>CONTROL +</b>	170 µl di controllo positivo ( <b>tappo di colore rosso</b> )
<b>CONTROL -</b>	2 x 1800 µl di controllo negativo ( <b>tappo di colore blu</b> )
<b>INSTRU</b>	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 3 è il DNA, estratto da tamponi urogenitali 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!)

- Estrarre i campioni del paziente e il NC. (Nota: il NC non può essere utilizzato senza estrazione nella PCR!)
- 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

- Scongela 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!**

- 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

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

### 7.4 Preparazione della reazione PCR

- Scongela 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

- Pipettare 10 µl di eluato campione nella Master mix.
- Pipettare 10 µl di controllo positivo (non preparato) nella Master mix.
- 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 3 è stato valutato con lo strumento LightCycler® 480 II (Roche).

### 8.1 Impostazione dei canali di rilevamento

	Virus dell'Herpes Simplex (tipo 1/2)	Treponema pallidum	Controllo interno (IC)
Colorante reporter	FAM	HEX	ATTO 647N
Colore	verde	giallo	rosso
Emissione	510 nm	580 nm	660 nm
Quencher	[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
<b>Amplificazione</b>	<b>45 cicli</b>	
• 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 3, 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

- 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.
- 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.
- 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.

	Virus dell'Herpes Simplex (tipo 1/2)	Treponema pallidum	Controllo interno (IC)
Colore			
verde	positivo		
giallo		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 del virus dell'Herpes Simplex e/o *Treponema pallidum* 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 3	Virus dell'Herpes Simplex (tipo 1/2) (n=19)	Treponema pallidum (n=10)
Negativo	0	0
Positivo	19	10
<b>Sensibilità</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

Tabella 2: Campioni definiti negativi

ampliCube STD Panel 3	Virus dell'Herpes Simplex (tipo 1/2) (n=10)	Treponema pallidum (n=10)
Negativo	10	10
Positivo	0	0
<b>Specificità</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

### 11.2 Sensibilità analitica

Il limite di rilevabilità (LoD) dell'ampliCube STD Panel 3 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

ità del 95% è stato definito mediante analisi probit con il software CombiStats™ versione 5.0 (Consiglio d'Europa).

**Tabella 3:** Limite di rilevabilità (LoD)

	Virus dell'Herpes Simplex (tipo 1/2)	Treponema pallidum
<b>LoD</b> Limite di rilevabilità del 95% Genoma/PCR	11,92 (6,26 – 32,33)	7,16 (4,23 – 16,51)

### 11.3 Specificità analitica

La ricerca in BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)) mostra che le sonde e i primer selezionati dell'ampliCube STD Panel 3 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 3.

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>Chlamydia trachomatis</i>	Coronavirus 229E
<i>Citrobacter freundii</i>	Coronavirus NL63
<i>Clostridium difficile</i>	Coronavirus OC43
<i>Clostridium perfringens</i>	Citomegalovirus
EHEC stx+	Enterovirus 68
EIEC/Shigella	Virus di Epstein-Barr
<i>Enterococcus faecalis</i>	Metapneumovirus umano A
ETEC	Virus dell'influenza A
<i>Haemophilus influenzae</i>	Virus dell'influenza B
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Virus del morbillo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Parotite
<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 sinciziale A
<i>Neisseria cinerea</i>	Virus respiratorio sinciziale B
<i>Neisseria gonorrhoe</i>	Rotavirus
<i>Proteus mirabilis</i>	Virus della varicella zoster
<i>Proteus vulgaris</i>	
<i>Salmonella typhimurium</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	

Nessuno di questi campioni ha mostrato un segnale positivo. Le sonde e i primer utilizzati nell'ampliCube STD Panel 3 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

1. P. French (2007): Syphilis. BMJ 2007; 334:143-7
2. 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.
3. Journal of Clinical Microbiology October 2014 Volume 52 Number 10 pp. 3693–3700
4. E. W. Hook (2016): Syphilis. the lancet Vol 389 April 15, 2017
5. D. Jaishankar et al (2016): Genital Herpes: Insights into Sexually Transmitted Infectious Disease. Microbial Cell, September 2016 Vol. 3 No. 9 pp: 438-450
6. 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
7. V. Lee et al (2008): Syphilis: an update. Clinical Medicine Vol 8 No 3 June 2008 pp: 330-333
8. J. Le Goff et al (2014): Diagnosis of genital herpes simplex virus. infection in the clinical laboratory. Virology Journal 2014, 11:83#
9. 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.
10. L.V. Stamm (2016): Syphilis: Re-emergence of an old foe. Microbial Cell September 2016 Vol. 3 No. 9 pp: 363-370

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

<b>ampliCube STD Panel 3</b>	Articolo n° <b>50303</b>
<b>Istruzioni per l'uso</b> valido da	GAACSD3002IT 2023-04
	<b>MIKROGEN GmbH</b> Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Germania Tel. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-mail <a href="mailto:mikrogen@mikrogen.de">mikrogen@mikrogen.de</a> Internet <a href="http://www.mikrogen.de">www.mikrogen.de</a>

