

CT/NG/TV/MG REALTIME PCR KIT

REF

RTPCR006-LPD



96

CE 0318

Für die *In-vitro*-Diagnostik

ZWECKBESTIMMUNG

Echtzeit-RT-PCR-Kit zum Nachweis von Nukleinsäure von *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Trichomonas vaginalis* (TV) und *Mycoplasma genitalium* (MG) in menschlichen endozervikalen, perianalen, urethralen und pharyngealen Exsudaten und Urin.

Die Benannte Stelle 0318 bewertete nur die Einhaltung der Vorschriften für *Chlamydia trachomatis*.

Das Gerät ist für den Einsatz in der Allgemeinbevölkerung bei Verdacht auf Infektion mit dem Mikroorganismus bestimmt.

Bei diesem Test handelt es sich um einen automatischen, qualitativen Test zur Diagnosehilfe.

EINLEITUNG

Chlamydiae sind unbewegliche, obligat intrazelluläre Bakterien mit einem einzigartigen Lebenszyklus, in dem sie zwei Stadien durchlaufen: Retikularkörper und Elementarkörper. *Chlamydia trachomatis* (CT) besteht aus zwei menschlichen Biovars: die Venerische Lymphknotenentzündung, bemerkenswert für seine Tropismus für lymphoide Zellen und seine Fähigkeit, systemische Erkrankung und das Trachom Biovar, begrenzt hauptsächlich auf Epithelzellen der Schleimhäute und in der Lage, Trachom, verursachen verursachen sexuell übertragbare Krankheit, und neonatale Aufnahme Konjunktivitis und Lungenentzündung.

Neisseria gonorrhoeae (NG) oder Gonococcus ist ein gramnegatives, Oxidase-positives, aerobes, kokkales Bakterium, das bezüglich der Wachstumsbedingungen anspruchsvoll ist und unter dem Mikroskop zu Diplokokken angeordnet erscheint. Der Mensch ist der einzige natürliche Wirt des Gonococcus, der durch Geschlechtsverkehr übertragen wird. Infektionen sind in der Regel auf Schleimhäute mit Zylinderepithel begrenzt, darunter den Harnleiter, den Gebärmutterhals, das Rektum, den Rachen und die Konjunktiva.

Trichomonas vaginalis (TV) ist ein begeißeltes Protozoon, das anscheinend keine Zysten ausbildet und nur schwer in der äußeren Umwelt überlebt. Es siedelt sich beim Menschen im unteren Genitaltrakt der Frau sowie dem Harnleiter und der Prostata des Mannes an und wird durch Geschlechtsverkehr übertragen. Es verursacht Vaginitis, Zervizitis und Urethritis.

Mycoplasma genitalium (MG) gehört zur Klasse der Mollicutes, die anspruchsvolle kleine (sowohl auf ihren Umfang als auch die Genomgröße bezogen) zellwandlose Bakterien repräsentieren, die in kleinen Kolonien wachsen. Es heftet sich an die Flimmerepithelzellen an. MG scheint bevorzugt das Gewebe des Urogenitaltrakts zu infizieren.

Dieses Kit basiert auf der Amplifikation spezifischer Fragmente von CT, NG, TV und MG in derselben Reaktionsvertiefung durch Echtzeit-PCR. Die Tatsache, dass durch diese Mikroorganismen verursachte Infektionen einige klinische Anzeichen gemeinsam haben, zeigt, wie wichtig eine schnelle und präzise klinische Diagnose ist.

PRÜFGRUNDSATZ

Dieser Kit basiert auf der Amplifikation spezifischer Fragmente des *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Trichomonas vaginalis* (TV) und *Mycoplasma genitalium* (MG) in derselben Reaktionsvertiefung durch Echtzeit-PCR.

Ein lyophilisierter Master-Mix (RT-PCR MIX) steht für das Screening und die zusätzliche Identifizierung der vier Mikroorganismen zur Verfügung.

Der PCR-Mix zielt auf zwei spezifische Fragmente des CT-Gens, ein spezifisches Fragment eines NG-Gens, ein spezifisches Fragment innerhalb des Genoms für TV und ein spezifisches Fragment eines MG-Gens.

Eine Amplifikationskontrolle ist enthalten, um die Abwesenheit eines Übertrags von Amplifikationsinhibitoren sowie den korrekten Amplifikationsablauf zu überprüfen. Diese Kontrolle besteht aus einem künstlichen Vektor und einem spezifischen Oligopaar/Sonde für die Amplifikation.

Die Methode gliedert sich in 2 wesentliche Schritte: DNA-Extraktion und Amplifikation/Nachweis durch spezifische Oligopaare und Sonden. CT-DNA wird im FAM-Kanal, NG-DNA im HEX/VIC-Kanal, TV-DNA im Cy5-Kanal und MG-DNA im

Texas/ROX-Kanal nachgewiesen. Die interne Kontrolle (IC) wird im Q705-Kanal nachgewiesen.

EIGENSCHAFTEN DES KITS

VIRCELL RT-PCR MIX und VIRCELL POSITIVE CONTROL sind lyophilisiert. Sie müssen vor dem Gebrauch erst rekonstituiert werden (siehe „Produktvorbehandlung“). Die restlichen Reagenzien sind schon gebrauchsfertig. Dieser Kit basiert auf der Amplifikation und dem Nachweis durch Echtzeit-PCR.

MITGELIEFERTER MATERIALIEN

[1] VIRCELL STD RT-PCR MIX LPD: 1 Platte mit 96 Röhrchen, teilbar in 12 Streifen mit 8 Röhrchen mit Taq-Polymerase, Puffer und spezifischen Primern/Sonde für CT (*pmpH*-Gen und eine spezifische Region innerhalb des pCTT1-Plasmids), NG (*opaI*-Gen), TV (*G3hp*-Gen) und MG (*mgpA*-Gen). Ebenso, Primer/Sonden für die interne Kontrolle. 1 Reaktion pro Röhrchen. Lyophilisiert.

[3] VIRCELL STD POSITIVE CONTROL: 1 Fläschchen mit einem Gemisch aus lyophilisierten nicht infektiösen Nukleinsäuren zur Verwendung als Positivkontrolle. Roter Verschluss.

[4] VIRCELL NEGATIVE CONTROL: 200 µl entionisiertem Wasser für den Gebrauch als Negativkontrolle. Grüner Verschluss.

[5] VIRCELL PCR MIX RECONSTITUTION SOLUTION: 2 x 1 ml wässriger Lösung für die Herstellung der PCR-Mischung. Gelber Verschluss.

[6] VIRCELL POSITIVE CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION: 500 µl wässriger Lösung zur Herstellung der Positivkontrolle. Brauner Verschluss.

[7] VIRCELL RT-PCR MIX CAPS: 12 Streifen mit 8 RT-PCR-kompatiblen Verschlüssen.

Spezielle Materialien, die benötigt, aber nicht mitgeliefert werden:

- Mikrobiologische Sicherheitswerkbank.
- DNA/RNA-Extraktions-Kit (siehe Empfehlungen unter „Testverfahren“).
- Real Time PCR Thermocycler (kompatibel mit weißen Röhrchen mit niedrigem Profil und FAM, HEX/VIC, Texas/ROX, Cy5 und Q705/Cy5.5-Detektion)
- Präzisions-Mikropipetten.
- Sterile Spitzen mit Aerosolbarriere.
- Mikrozentrifuge.
- PCR-Kabine (empfohlen).
- Vortex.

LAGERUNGS- UND HANDHABUNGSBEDINGUNGEN

Bei 2-8°C lagern. Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums einsetzen. Das Verfallsdatum der Reagenzien ist nur gültig bei Lagerung in gut verschlossenem Zustand bei 2-8°C.

HALTBARKEIT NACH ANBRUCH

VIRCELL POSITIVE CONTROL rekonstituiert: zwischen -25°C und -15°C lagern und bis zum Verfallsdatum aufbrauchen. Mehr als 10 Gefrier-Auftau-Zyklen während dieser Zeitspanne vermeiden.

VIRCELL RT-PCR MIX rekonstituiert: Zwischen 2°C und 8°C lagern und innerhalb von 60 Minuten aufbrauchen.

Restliche Reagenzien: Siehe Verfallsdatum auf der Packung (bei 2-8°C).

VIRCELL, S.L. ist nicht verantwortlich für Fehler, die durch eine falsche Handhabung der Reagenzien dieses Kits verursacht wurden.

WARNUNGEN UND VORSICHTSHINWEISE

1. Einsatz ausschließlich für *in-vitro* diagnostische Zwecke. Nur für den professionellen Einsatz.
2. Das Produkt sollte auf Personal begrenzt werden, das in der Technik geschult wurde.
3. Dem Anwender des Tests wird empfohlen, diese Gebrauchsanleitung vor der Testdurchführung sorgfältig zu lesen und die einzelnen Schritte nachzuvollziehen. Die strikte Einhaltung der Gebrauchsanleitung ist notwendig.
4. Verwenden Sie nur die in dieser Broschüre beschriebenen Protokolle. Wenn die Bedingungen nicht den Angaben entsprechen, sind die Ergebnisse möglicherweise falsch.
5. Tragen Sie beim Umgang mit Proben und Reagenzien persönliche Schutzausrüstung. Waschen Sie Ihre Hände beim Umgang mit Proben und Reagenzien gründlich. Alle Verfahren müssen in Übereinstimmung mit den genehmigten Sicherheitsstandards durchgeführt werden.
6. Für jeden Testschritt neue Pipettenspitzen verwenden. Nur sauberes, vorzugsweise Einweg-Material verwenden.
7. Nicht mit dem Mund pipettieren.

8. Keine beschädigten Kits verwenden.
9. Verwenden Sie das Kit nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr.
10. Lassen Sie die Reagenzien nicht länger als unbedingt erforderlich auf einer anderen Temperatur als empfohlen.
11. Halten Sie Behälter für Proben und Reagenzien geschlossen, wenn diese nicht bearbeitet werden.
12. Vermeiden Sie die Verwendung von Proben, die wiederholten Gefrier-Auftau-Zyklen ausgesetzt sind.
13. Verwenden unter aseptischen Bedingungen, um eine mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
14. Die Reagenzien in diesem Kit können Nukleinsäuren enthalten. Beachten Sie die lokalen Bestimmungen für Abfälle.
15. Jedes nicht verwendete Material muss gemäß den geltenden Bestimmungen entsorgt werden.
16. Nur Kit-Bestandteile verwenden. Reagenzien aus Kits unterschiedlicher Chargennummer oder von anderen Herstellern dürfen nicht verwendet werden. Nur VIRCELL NEGATIVE CONTROL, VIRCELL PCR MIX RECONSTITUTION SOLUTION und VIRCELL POSITIVE CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION sind mit entsprechenden, weiteren RTPCR VIRCELL-Referenzen und -Artikeln kompatibel.
17. Die Proben müssen gemäß den Sicherheitsverfahren in Laboratorien so behandelt werden, als wären sie infektiös, gemäß den Sicherheitsverfahren in Laboratorien. Halten Sie alle Arbeitsflächen mit einer frisch hergestellten Lösung aus 0,5% Natriumhypochlorit in entionisiertem oder destilliertem Wasser sauber und steril.
18. Um zuverlässigere Ergebnisse zu erhalten, ist es ratsam, die Proben so früh wie möglich nach deren Gewinnung zu testen. Es sind keine Untersuchungen über die Auswirkungen der Transportzeit durchgeführt worden.
19. Für die Durchführung des Tests ist es notwendig, über voneinander getrennte Arbeitsbereiche zu verfügen: einen Bereich vor der Amplifikation und einen Bereich für die Amplifikation.
20. Wegen der hohen analytischen Sensitivität des Tests müssen die Vorsichtsmaßnahmen verschärft werden, um die Reinheit der Reagenzien des Kits und der Amplifikationsmischungen zu gewährleisten. Alle verwendeten Reagenzien müssen den höchsten Reinheitsgrad aufweisen.
21. Es wird empfohlen, konventionelle DNA-Reinigungskits zu verwenden.
22. Alle im Zusammenhang mit dem Produkt auftretenden schwerwiegenden Vorfälle sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

BEDINGUNGEN FÜR DIE ENTHNAHME, BEHANDLUNG UND AUFBEREITUNG DER PROBE

Das Kit kann für klinische Proben wie endozervikale, perianale, urethrale, pharyngeale Exsudate und Urin verwendet werden. Verzögerungen bei Transport und Laboruntersuchungen sollten vermieden werden. Falls eine sofortige Lieferung an das Labor nicht möglich ist, sollten die Proben im Kühlschrank (2 bis 8 °C). Proben, deren Kultivierung sich über 48 Stunden nach der Entnahme hinaus verzögert, bei -70 °C oder niedriger lagern; Einfrieren bei höheren Temperaturen und Gefrier-Auftau-Zyklen vermeiden. Empfohlene Leitlinien: Specimen Collection and Processing. p.10.4.6. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd ed. ASM, Washington (Probenentnahme und -verarbeitung. S.10.4.6. Handbuch für klinische mikrobiologische Verfahren, 2. Aufl., ASM, Washington).

PRODUKTVORBEHANDLUNG

Alle gelieferten Reagenzien sind gebrauchsfertig, außer VIRCELL RT-PCR MIX [1] und VIRCELL POSITIVE CONTROL [3].

[1] VIRCELL RT-PCR MIX. Fügen Sie für die Rekonstitution pro Fläschchen 10 µl VIRCELL PCR MIX RECONSTITUTION SOLUTION [5] hinzu.

⚠ Sollte sich der Beginn des Tests verzögern, muss der rekonstituierte VIRCELL RT-PCR MIX innerhalb von 60 Minuten nach Zugabe der Rekonstitutionslösung verwendet und bei 2-8°C gelagert werden. In diesem Fall empfiehlt sich ein Gefriergestell.

[3] VIRCELL POSITIVE CONTROL. Führen Sie für die Rekonstitution die folgenden Schritte aus:

- Zentrifugieren Sie das entsprechende Röhrchen 5 Sekunden lang bei 5000 g.
 - Fügen Sie 100 µl VIRCELL POSITIVE CONTROL RECONSTITUTION SOLUTION [6] hinzu.
 - Mischen Sie 1-2 Sekunden lang mit einem Vortexmischer.
 - Zentrifugieren Sie das Röhrchen 5 Sekunden lang bei 5000 g.
- Nach der Rekonstitution kann die VIRCELL POSITIVE CONTROL [3] bei Temperaturen unter -25 bis -15 °C eingefroren werden für ihren Gebrauch bei späteren Ansätzen.

TESTVERFAHREN

1. DNA-Extraktion (durchgeführt im Prä-Amplifikationsbereich):
 - 1.1. Es wird empfohlen, ein kommerzielles Extraktionskit für DNA-Extraktionen zu verwenden. Bei der Verwendung von kommerziellen Extraktionskits sind die Anweisungen des Herstellers zu befolgen. Kontakt zum Kundendienst.
2. Amplifikation mit RT-PCR (durchgeführt im Amplifikationsbereich):
 - 2.1. Rekonstitution des VIRCELL RT-PCR MIX: Die mitgelieferte Platte mit 96 Röhrchen könnte je nach zu testenden Proben leicht in einen oder mehrere einzelne 8-Röhrchen-Streifen geteilt werden. Fügen Sie pro Fläschchen 10 µl VIRCELL PCR MIX RECONSTITUTION SOLUTION [5] hinzu. Nach der Rekonstitution/dem Auftauen kalt halten.
 - 2.2. Hinzufügen der Probe: Fügen Sie jedem Röhrchen 10 µl jeder extrahierten DNA-Probe hinzu. Fügen Sie den entsprechenden Röhrchen 10 µl VIRCELL POSITIVE CONTROL [3] und VIRCELL NEGATIVE CONTROL [4] hinzu. Die Negativkontrolle ist Wasser.
 - 2.3. Verschließen Sie die Röhrchen mit VIRCELL RT-PCR MIX CAPS [7].
 - 2.4. Es wird empfohlen, die Platte/-streifen kurz zu zentrifugieren, um sicherzustellen, dass sich der Fläschcheninhalt unten im Röhrchen befindet.
 - 2.5. RT-PCR-Programm: Geben Sie die PCR-Röhrchen in den Echtzeit-Thermocycler und führen Sie das folgende Programm* aus:

1 Zyklus	95 °C	3 Minuten
45 Zyklen	95 °C	15 Sekunden
	58 °C	45 Sekunden*

* Fluoreszenzdaten (FAM, HEX/VIC, Texas/ROX, Cy5 und Q705/Cy5.5) sollten erfasst werden.

INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Jede Charge wird unter Einhaltung strenger Vorgaben internen Qualitätskontrollen unterzogen, bevor sie freigegeben wird.

TEST-VALIDIERUNG FÜR ANWENDER

Bei jeder Testdurchführung muss eine Negativkontrolle mit eingeschlossen werden. Durch die Negativkontrolle wird die Kontamination des Reagenzes oder der Umgebung überprüft.

Es wird empfohlen, die Positivkontrolle bei jedem Durchlauf einzubeziehen. Die Positivkontrolle überprüft auf fehlerhafte Reagenzien und die korrekte Durchführung des Arbeitsvorgangs.

Die Thermocycler Software berechnet voraussichtlich automatisch den Baseline-Fluoreszenzwert (Schwellenwert) auf Grundlage der Amplifikationskurve für jedes Zielgen (Fluoreszenzdetektion). Dennoch wird empfohlen, die Schwellenwerte für die verschiedenen Detektionskanäle individuell festzulegen. Um einen Schwellenwert für jedes Zielgen festzulegen, wird empfohlen, die Amplifikationskurven der positiven und negativen Kontrollen als Referenz zu verwenden. Der Schwellenwert sollte auf den Beginn des exponentiellen Anstiegs der gemessenen Fluoreszenz und oberhalb des Hintergrundsignals festgelegt werden.

Die Ergebnisinterpretation der Kontrollen lautet wie folgt:

KONTROLLE	CT (FAM)	NG (HEX/VIC)	TV (Cy5)	MG (Texas/ROX)	IC (Q705)	Interpretation
VIRCELL STD POSITIVE CONTROL	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Korrekt
	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Ungültig
VIRCELL NEGATIVE CONTROL	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Korrekt
	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Ungültig

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisinterpretation wird in den nachstehenden Tabellen dargestellt:

ERGEBNIS	CT (FAM)	NG (HEX/VIC)	TV (Cy5)	MG (Texas/ROX)	IC (Q705) ¹	Interpretation
1	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Ungültig (Probe / den Kit/Ablauf betreffend)
2	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Negative
3	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	CT
4	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	NG
5	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	TV
6	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	MG
7	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	CT + NG
8	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	CT + TV
9	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	CT + MG
10	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	NG + MG
11	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	NG + TV
12	Keine Amplifikation oder Ct >40	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	TV + MG
13	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	CT + NG + TV
14	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	CT + TV + MG
15	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	CT + NG +MG
16	Keine Amplifikation oder Ct >40	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	NG + TV + MG
17	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40)	Amplifikation (Ct < 40) oder Keine Amplifikation	CT + NG + TV + MG

¹ Bei einer hohen Vervielfältigungszahl der Zielnukleinsäure kann die Amplifikation der internen Kontrolle (IC) in den Ergebnissen 3 bis 17 beeinträchtigt sein. Die späte Amplifikation oder eine fehlende IC-Amplifikation ändert nichts an der Interpretation des Ergebnisses.

Bei einem ungültigen oder unklaren Ergebnis wird empfohlen, die DNA-Extraktion aus der Originalprobe zu wiederholen und erneut zu testen. Bei einer fehlgeschlagenen Amplifikation der internen Kontrolle kann eine unsachgemäße Extraktion von Nukleinsäuren oder eine Hemmung der Amplifikation angenommen werden. Es wird empfohlen, eine neue Probe zu testen.

VERWENDUNGSBESCHRÄNKUNGEN

- Die Eignung für andere Probenarten als Urin, endozervikale, perianale, urethrale und pharyngeale Exsudate wurde nicht untersucht. Da nicht genügend positive Proben zur Verfügung standen, konnte die Validierung von TV nur an endozervikalen Proben vorgenommen werden, während sie im Fall von MG nicht an pharyngealen Proben durchgeführt werden konnte.
- Das Gerät ist zum Nachweis des Infektionserregers bestimmt, es dient nicht zum Nachweis der Exposition gegenüber dem Infektionserreger.
- Das Gerät ist nicht zur Verwendung mit Proben bestimmt, die aus Liquor oder Blut stammen.
- Das Gerät ist außerdem nicht zum Nachweis der Anwesenheit von oder der Exposition gegenüber einem übertragbaren Erreger in biologischen Proben bestimmt, um deren Eignung zur Transfusion, Transplantation oder Zellverabreichung zu beurteilen.
- Das Gerät ist nicht zum Nachweis von Antikörpern zur Erkennung des latenten Krankheitsstatus einer Virusinfektion vor einer Organ- oder Knochenmarkstransplantation bestimmt.

6. Die Ergebnisse der Proben sollten immer in Verbindung mit den klinischen Daten und anderen diagnostischen Ergebnissen interpretiert werden.

7. Der Nachweis von Nukleinsäuren der Erreger hängt von der Anzahl in der Probe ab und kann durch Probenahmeverfahren, Patientenfaktoren, das Infektionsstadium und/oder den Erregerstamm beeinträchtigt werden. Falsch negative Ergebnisse können auch entstehen, wenn Amplifikationsinhibitoren in der Probe vorhanden sind. Der Testkit wurde mit einer spezifischen Nukleinsäure-Extraktionsmethode validiert. Alternative Extraktionsverfahren können ebenso geeignet sein, müssen aber vom Anwender validiert werden. Ein 260/280-Reinheitsverhältnis zwischen 1,8 und 2,0 ist akzeptabel.

8. Die Ergebnisse des Tests sind qualitativer Natur. Es existiert keinerlei Korrelation zwischen der Größe des positiven Ergebnisses und der Anzahl an Mikroorganismen in der Probe.

9. Der Test funktioniert nur innerhalb der Grenzen der genomischen Regionen, für die die Sonden ausgewählt worden sind. Der Test zielt auf stark konservierte Regionen ab, Aufgrund der hohen Variabilität der DNA Genome, ist es möglich,

dass bestimmte Subtypen nicht festgestellt werden. Zur Zeit der Entwicklung wurden keine Mutationen der Zielregionen detektiert.

10. Ein negatives Ergebnis schließt das Vorhandensein des Mikroorganismus in Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze des Tests nicht aus.

11. Ein positiver Test schließt die Möglichkeit nicht aus, dass andere Pathogene vorhanden sind.

12. Die in der Studie zur Sensitivität und Spezifität ermittelten Werte beziehen sich auf die Gesamtzahl der getesteten Proben und können je nach Art der Probe variieren. Die in der Studie zur Sensitivität und Spezifität von *Chlamydia trachomatis* ermittelten Werte beziehen sich auf die Gesamtzahl der getesteten Proben und können je nach Art der Probe variieren.

13. Die angezeigten Leistungsergebnisse wurden unter der Verwendung des Thermocyclers CFX96 (Bio-Rad) generiert.

14. Die angegebenen Testergebnisse entsprechen komparativen Studien mit kommerziellen prädikativen Produkten in einer definierten Bevölkerungsstichprobe. Es können kleine Unterschiede zwischen verschiedenen Bevölkerungen oder verschiedenen prädikativen Produkten bestehen.

LEISTUNGSMERKMALE

SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

Chlamydia trachomatis

Klinisch positive menschliche Urinproben sowie endozervikale, perianale, urethrale und pharyngeale Abstriche (n=270) wurden mit dem OptiPure Viral Kit auf dem Maelstrom 4800 Instrument (TANBead) extrahiert und mit einem kommerziellen Real Time PCR Kit in CFX96 (Bio-Rad) getestet. Zuvor bestätigte negative Proben (n=100) wurden ebenfalls in das Assay-Verfahren aufgenommen.

Die Ergebnisse lauteten wie folgt:

Probe Nr	370	
Sensitivität (%)	99	
	95% CI	98-100
Spezifität (%)	100	
	95% CI	96-100
PPV (%)	100	
NPV (%)	99	
LR+/LR-	-1,01 / -0,99	
Echt-positiv	269	
Echt-negativ	100	
Falsch-positiv	0	
Falsch-negativ	1	
Grenzfälle	0	

CI: Konfidenzintervall
PPV: Positiver prädiktiver Wert
NPV: Negativer prädiktiver Wert
LR+: Positives Wahrscheinlichkeitsverhältnis
LR-: Negatives Wahrscheinlichkeitsverhältnis

Mycoplasma genitalium

Klinisch positive menschliche Urinproben sowie endozervikale, perianale und urethrale Abstriche (n=96) wurden mit dem OptiPure Viral-Kit auf dem Maelstrom 4800-Gerät (TANBead) extrahiert und mit einem handelsüblichen Echtzeit-PCR-Kit im CFX96 (Bio-Rad) verglichen. Zuvor bestätigte negative Proben (n=100) wurden ebenfalls in das Assay-Verfahren aufgenommen.

Die Ergebnisse lauteten wie folgt:

Probe Nr	196	
Sensitivität (%)	99	
	95% CI	94-100
Spezifität (%)	100	
	95% CI	96-100
PPV (%)	100	
NPV (%)	99	
LR+/LR-	-1,00 / -0,98	
Echt-positiv	95	
Echt-negativ	100	
Falsch-positiv	0	
Falsch-negativ	1	
Grenzfälle	0	

CI: Konfidenzintervall
PPV: Positiver prädiktiver Wert
NPV: Negativer prädiktiver Wert
LR+: Positives Wahrscheinlichkeitsverhältnis
LR-: Negatives Wahrscheinlichkeitsverhältnis

Neisseria gonorrhoeae

Klinisch positive menschliche Urinproben sowie endozervikale, perianale, urethrale und pharyngeale Abstriche (n=232) wurden mit dem OptiPure Viral Kit auf dem

Maelstrom 4800 Instrument (TANBead) extrahiert und mit einem kommerziellen Real Time PCR Kit in CFX96 (Bio-Rad) getestet. Zuvor bestätigte negative Proben (n=100) wurden ebenfalls in das Assay-Verfahren aufgenommen.

Die Ergebnisse lauteten wie folgt:

Probe Nr	332	
Sensitivität (%)	98	
	95% CI	96-100
Spezifität (%)	100	
	95% CI	96-100
PPV (%)	100	
NPV (%)	96	
LR+/LR-	-0,99 / -0,97	
Echt-positiv	228	
Echt-negativ	100	
Falsch-positiv	0	
Falsch-negativ	4	
Grenzfälle	0	

CI: Konfidenzintervall
PPV: Positiver prädiktiver Wert
NPV: Negativer prädiktiver Wert
LR+: Positives Wahrscheinlichkeitsverhältnis
LR-: Negatives Wahrscheinlichkeitsverhältnis

Trichomonas vaginalis

Klinisch positive humane endozervikale Abstrichproben (n=43) wurden mit dem OptiPure Viral Kit auf dem Maelstrom 4800 Instrument (TANBead) extrahiert und mit einem handelsüblichen Echtzeit-PCR-Kit im CFX96 (Bio-Rad) verglichen. Zuvor bestätigte negative Proben (n=100) wurden ebenfalls in das Assay-Verfahren aufgenommen.

Die Ergebnisse lauteten wie folgt:

Probe Nr	143	
Sensitivität (%)	98	
	95% CI	88-100
Spezifität (%)	100	
	95% CI	96-100
PPV (%)	100	
NPV (%)	99	
LR+/LR-	-0,99 / -0,97	
Echt-positiv	42	
Echt-negativ	100	
Falsch-positiv	0	
Falsch-negativ	1	
Grenzfälle	0	

CI: Konfidenzintervall
PPV: Positiver prädiktiver Wert
NPV: Negativer prädiktiver Wert
LR+: Positives Wahrscheinlichkeitsverhältnis
LR-: Negatives Wahrscheinlichkeitsverhältnis

GENAUIGKEIT

4 Proben (2 positive und die Positiv- und Negativkontrolle) wurden zweimal in 2 Durchläufen pro Tag in 2 verschiedenen qRT-PCR-Thermocyclern an 20 aufeinanderfolgenden Tagen amplifiziert. Die Proben wurden auf dem CFX96 (Bio-Rad) getestet. Es wurden die Genauigkeit innerhalb eines Durchlaufs, die Genauigkeit zwischen den Durchläufen, die Genauigkeit zwischen den Tagen und die Genauigkeit zwischen den Labors ermittelt.

Die Ergebnisse lauteten wie folgt:

Chlamydia trachomatis

Probe	Genauigkeit innerhalb eines Durchlaufs %CV	Genauigkeit zwischen den Durchläufen %CV	Genauigkeit zwischen den Tagen %CV	Genauigkeit zwischen den Labors %CV
Positiven Kontrolle	0,4	0,4	0,7	0,9
Positive Probe 1	0,9	0,4	0,7	1,2
Positive Probe 2	0,8	0,9	0,7	1,4
Negativkontrolle	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation

CV: Variationskoeffizient

Mycoplasma genitalium

Probe	Genauigkeit innerhalb eines Durchlaufs %CV	Genauigkeit zwischen den Durchläufen %CV	Genauigkeit zwischen den Tagen %CV	Genauigkeit zwischen den Labors %CV
Positiven Kontrolle	0,6	0,9	0,6	1,2
Positive Probe 1	0,8	1,3	0,4	1,5
Positive Probe 2	0,8	1,0	0,5	1,4
Negativkontrolle	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation

CV: Variationskoeffizient

Neisseria gonorrhoeae

Probe	Genauigkeit innerhalb eines Durchlaufs %CV	Genauigkeit zwischen den Durchläufen %CV	Genauigkeit zwischen den Tagen %CV	Genauigkeit zwischen den Labors %CV
Positiven Kontrolle	1,5	0,5	0,6	1,6
Positive Probe 1	0,5	0,8	0,4	1,0
Positive Probe 2	0,8	0,9	0,5	1,3
Negativkontrolle	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation

CV: Variationskoeffizient

Trichomonas vaginalis

Probe	Genauigkeit innerhalb eines Durchlaufs %CV	Genauigkeit zwischen den Durchläufen %CV	Genauigkeit zwischen den Tagen %CV	Genauigkeit zwischen den Labors %CV
Positiven Kontrolle	2,8	0,7	2,4	3,6
Positive Probe 1	2,2	2,2	2,4	4,0
Positive Probe 2	1,8	1,4	2,5	3,4
Negativkontrolle	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation	Keine Amplifikation

CV: Variationskoeffizient

KREUZREAKTIVITÄT

Auch wurde eine Studie durchgeführt, um die Wirkung potenziell kreuzreaktiver Mikroorganismen zu bewerten.

Die Ergebnisse lauteten wie folgt:

Mikroorganismen	Probe Nr	Positive Nr
<i>Candida albicans</i>	1	0
<i>Candida auris</i>	1	0
<i>Candida dubliniensis</i>	1	0
<i>Candida guilliermondii</i>	1	0
<i>Candida glabrata</i>	1	0
<i>Candida krusei</i>	1	0
<i>Candida parapsilosis</i>	1	0
<i>Candida tropicalis</i>	1	0
<i>Chlamydomyphila pneumoniae</i>	1	0
<i>Chlamydomyphila psittaci</i>	1	0
Zytomegalie-Virus	1	0
Coronavirus (HCoV-229E)	1	0
Enterovirus 68	1	0
Epstein-Barr Virus	1	0
<i>Escherichia coli</i> (EAEC)	1	0
<i>Gardnerella vaginalis</i>	1	0
<i>Helicobacter pylori</i>	1	0
Herpes simplex Virus Typ 1	1	0
Herpes simplex Virus Typ 2	1	0
<i>Lactobacillus jensenii</i>	1	0
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1	0

Mikroorganismen	Probe Nr	Positive Nr
<i>Mycoplasma hominis</i>	1	0
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1	0
<i>Neisseria lactamica</i>	1	0
<i>Neisseria meningitidis serogruppe A</i>	1	0
<i>Neisseria mucosa</i>	1	0
<i>Neisseria perflava</i>	1	0
<i>Neisseria polysacchara</i>	1	0
<i>Neisseria sicca</i>	1	0
Papillomavirus Typ 16 (Ca-Ski-Zellen)	1	0
Papillomavirus Typ 18 (HeLa-Zellen)	1	0
<i>Shigella flexneri</i>	1	0
<i>Staphylococcus aureus (mecA-)</i>	1	0
<i>Treponema pallidum</i>	1	0
<i>Ureaplasma parvum</i>	1	0
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	1	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0
INSGESAMT	39	0

Zusätzlich wurde eine in-silico-Analyse der Primer-/Sondensequenzen zum Vergleich mit anderen Mikroorganismen, die in die in klinischen Proben gefunden werden können, durchgeführt.

Die Ergebnisse lauteten wie folgt:

Mikroorganismen	Homologie >80%			
	CT	MG	NG	TV
<i>Atopobium parvulum</i>	No	No	No	No
<i>Bacteroides caccae</i>	No	No	No	No
<i>Bacteroides fragilis</i>	No	No	No	No
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	No	No	No	No
<i>Candida metapsilosis</i>	No	No	No	No
<i>Haemophilus ducreyi</i>	No	No	No	No
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	No	No	No	No
<i>Lactobacillus crispatus</i>	No	No	No	No
<i>Mobiluncus mulieris</i>	No	No	No	No
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	No	No	No	No
<i>Prevotella bivia</i>	No	No	No	No
Hepatitis A-Virus	No	No	No	No
Hepatitis B-Virus	No	No	No	No
Hepatitis C-Virus	No	No	No	No

Eine Homologie von über 80 % wurde in keinem der analysierten Mikroorganismen gefunden.

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Die LOD (Limit of Detection) für CT, NG, TV und MG wurde bestimmt durch Testen von DNA-Kontrollen (AMPLIRUN® CHLAMYDIA TRACHOMATIS DNA CONTROL; AMPLIRUN® NEISSERIA GONORRHOEA DNA CONTROL; AMPLIRUN® TRICHOMONAS VAGINALIS DNA CONTROL; AMPLIRUN® MYCOPLASMA GENITALIUM DNA CONTROL).

Es wurde eine vorläufige LOD (Limit of Detection) bestimmt, indem seriellen Verdünnungen quantifizierter CT-, NG-, TV- und MG-Proben getestet wurden. Der Test wurde mit dem Thermocycler CFX96 (Bio-Rad) durchgeführt.

Nach dem Festlegen einer angenäherten LoD wurde die Endkonzentration bestätigt, indem 3 serielle Verdünnungen getestet wurden. Für jede Verdünnung werden mindestens 20 Replikate getestet.

Die LoD wird als die niedrigste Konzentration bestimmt, in der ≥ 95 % der Replikate positiv sind.

	CT	MG	NG	TV
LoD (kopien/μL)	1,3	1,4	0,18	0,01
LoD (kopien/mL)	1300	1400	180	10
LoD (kopien/reaktion)	13	14	1,8	0,1

INKLUSIVITÄT

Es wurde eine in-silico-Analyse der im Test enthaltenen analysierten Gene durchgeführt, um die Inklusivität für die verschiedenen vorhandenen CT, NG, TV und MG-Sequenzen zu bestimmen.

Die Kriterien für die Einbeziehung der verschiedenen Sequenzen in die Analyse waren geografische Daten und das Datum, an dem die Sequenz hinterlegt wurde. In die Analyse jedes Mikroorganismus wurden verschiedene Abstammungslinien, Typen oder Subtypen einbezogen.

Der Zugriff auf die Sequenzen erfolgte über die Datenbanken der GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Die Ergebnisse der In-silico-Analyse zeigen, dass der CT/NG/TV/MG REALTIME PCR KIT voraussichtlich alle derzeit verfügbaren CT, NG, TV und MG -Sequenzen nachweisen wird. Außerdem wurden fünf Stämme der NG-Sammlung (WHO V, WHO K, WHO Y, F-18 und CDC Ng-116) und fünf CT-Stämme, darunter die Serovare L, B, J, D und E, getestet, was bei allen Fällen zu den erwarteten Ergebnissen führte.

EXTERNE KONTROLLE

Die folgenden Kontrollen sind erforderlich, werden aber nicht mit dem Test-Kit geliefert:

- als positive Extraktionskontrolle, AMPLIRUN® TOTAL CT/NG/TV/MGE CONTROL (SWAB) Kat. MBTC024-R (Vircell)

Externe Kontrollen helfen bei der Kontrolle von Kreuzkontaminationen während des Extraktionsvorgangs und dienen zusätzlich als Validierungsinstrument für Extraktionsreagenzien.

BENUTZTE ETIKETTEN-SYMBOLE



Für die *In-vitro* Diagnostik



Verwendbar bis (Verfallsdatum)



Bei x-y°C lagern



Inhalt ausreichend für <n> Bestimmungen



Chargen-Nummer



Bestell-Nummer



Gebrauchsanleitung beachten



Rekonstituieren in <X> µl



Hersteller

LITERATUR

1. Ceovic, R. and Gulin, S.J. 2015. Lymphogranuloma venereum: diagnostic and treatment challenges. *Infection and Drug Resistance*, Mar, 8:39–47. doi: 10.2147/IDR.S57540.
2. Golparian, D. et al. 2013. Analytical Specificity and Sensitivity of the APTIMA Combo 2 and APTIMA GC Assays for Detection of Commensal Neisseria Species and Neisseria gonorrhoeae on the Gen-Probe Panther Instrument. *Sex Transm Dis*, Feb, 40(2):175-178. doi: 10.1097/OLQ.0b013e3182787e45.
3. Ison, C.A. et al. 2013. Evolution of Neisseria gonorrhoeae is a continuing challenge for molecular detection of gonorrhoea: false negative gonococcal porA mutants are spreading internationally. *Sex Transm Infect*, May, 89(3):197-201. doi:10.1136/sextrans-2012-050829.
4. Isenberg, H. D. 2004. Specimen Collection and Processing. p.10.4.6. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd ed. ASM, Washington.
5. Papp, J.R. et al. 2014. Recommendations for the Laboratory-Based Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports*, March, 63(2).
6. Pillay, A. et al. 2007. Comparison of a TaqMan-based real-time polymerase chain reaction with conventional tests for the detection of Trichomonas vaginalis. *Sex Transm Infect*, Apr, 83(2):126–129. doi: 10.1136/STD.2006.022376.
7. Shipitsyna, E. et al. 2010. Guidelines for the Laboratory Diagnosis of Mycoplasma genitalium Infections in East European Countries. *Acta Derm Venereol*, Sep, 90(5):461-467. doi: 10.2340/00015555-0929.

8. Unemo, M. et al. 2010. The Swedish new variant of Chlamydia trachomatis: genome sequence, morphology, cell tropism and phenotypic characterization. *Microbiology*, May, 156(Pt 5):1394–1404. doi: 10.1099/mic.0.036830-0.

9. World Health Organization. 2013. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. ISBN 978 92 4 150584 0.

Versionsnummer: L-RTPCR006-LPD-DE-02

Datum: 2023/11/09

Vorhergehende Version: L-RTPCR006-LPD-DE-01

Aktualisierungen: siehe „Änderung in Kapitel“

Änderung in Kapitel: ZWECKBESTIMMUNG, Spezielle Materialien, die benötigt, aber nicht mitgeliefert werden; HALTBARKEIT NACH ANBRUCH, BEDINGUNGEN FÜR DIE ENTNAHME, BEHANDLUNG UND AUFBEREITUNG DER PROBE, VERWENDUNGSBESCHRÄNKUNGEN, SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT, KREUZREAKTIVITÄT, INKLUSIVITÄT