

RIDA® GENE STI Mycoplasma Panel

REF PG4945



1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA®GENE STI Mycoplasma Panel ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis von *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* und *Ureaplasma urealyticum/parvum* aus humanen Genitalabstrichen und Urin.

Die RIDA®GENE STI Mycoplasma Panel multiplex real-time PCR soll die Diagnose einer durch *Mycoplasmen/Ureaplasmen* verursachte Harnwegsinfektion oder Entzündung im Genitalbereich unterstützen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Mycoplasmen-Spezies können als Teil der Normalflora entweder im Respirationstrakt oder Genitalbereich des Menschen persistieren¹. Von den hauptsächlich im Genitalbereich vorkommenden Spezies sind unter anderem *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* und *Ureaplasma parvum* als humanpathogen beschrieben.^{1,2}

Mycoplasma hominis (*M. hominis*) kolonisiert häufig den Genitaltrakt von sexuell-aktiven Männern und Frauen, jedoch werden die häufigsten durch *M. hominis* verursachten Infektionen in Frauen diagnostiziert.² *M. hominis* wird mit entzündlicher Beckenerkrankung (PID) assoziiert und kann Infektionen während und nach der Schwangerschaft hervorrufen, wie z. B. Endometritis oder auch eine Pneumonie in Neugeborenen.¹ Häufige Symptome bei einer *M. hominis*-Infektion sind u.a. gesteigerter Harndrang, gelblicher Ausfluss oder Brennen beim Wasserlassen.^{1,3}

In der globalen Population hat *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*) eine Prävalenz von 1 – 4 % in Männern und zwischen 1 – 6.4 % in Frauen. *M. genitalium* kann in Männern zu einer unspezifischen Harnröhrenentzündung führen und ist nach *Chlamydia trachomatis* die zweithäufigste Ursache für diese Erkrankung. Ca. 30 % der persistierenden Urethritis werden mit *M. genitalium* in Verbindung gebracht. In Frauen kann eine *M. genitalium*-Infektion zu einer Cervicitis, Endometritis, Urethritis oder auch zu einer entzündlichen Beckenerkrankung (PID) führen.^{1,4}

Ureaplasma urealyticum (*U. urealyticum*) und *Ureaplasma parvum* (*U. parvum*) sind parasitär-lebende, gram-negative Bakterien und können Teil der Urogenitalflora beim Mann und bei der Frau sein. Die früher bestehende Nomenklatur der 14 Serovare von *U. urealyticum* wurde 2002 überarbeitet, wobei nun die Serovare 1,3,6 und 14, welche zum Parvo-Biovar (Biovar 1) gehören, als separate Spezies (*U. parvum*) gesehen werden. Die Serovare 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 und 13 gehören dem T960-Biovar (Biovar 2) an und sind somit der Spezies *U. urealyticum* zugeordnet.⁵ Bei Frauen verursacht *U. urealyticum* häufig eine entzündliche Beckenerkrankung (PID) und *Ureaplasmen* können bei bis zu 50 % der Schwangeren die Vaginalflora kolonisieren. Während der Schwangerschaft können *Ureaplasmen* auch auf das Kind übertragen werden, wodurch Pneumonien oder Erkrankungen des zentralen Nervensystems entstehen können.¹

3. Testprinzip

RIDA®GENE STI Mycoplasma Panel ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis von *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* und *Ureaplasma urealyticum/parvum* aus humanen Genitalabstrichen und Urin. Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente von *Mycoplasma hominis* (16S-rRNA), *Mycoplasma genitalium* (IGS) und *Ureaplasma urealyticum/parvum* (16S-rRNA) amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die Taq-Polymerase den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA®GENE STI Mycoplasma Test enthält eine Internal Control DNA (ICD), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR Inhibition kontrollieren zu können.

4. Packungsinhalt

Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen.)

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	gelb
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rot
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	weiß
P	Positive Control	1x	200 µl	blau

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können **ungeöffnet** bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 20 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA®GENE STI Mycoplasma Panel multiplex real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR-Geräten:

Tab. 2: Benötigtes Zubehör

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm	RIDA®Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Real-time PCR-Geräte	
Roche	LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR-Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II **und des LightCycler® 480 z**
- Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- **PCR-Wasser (Nuklease-frei)**

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter www.r-biopharm.com.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 DNA-Präparation aus trockenen Genitalabstrichen

Für die DNA-Präparation aus trockenen Genitalabstrichen wird ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionskit (z.B. RIDA® Xtract (R-Biopharm)) oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell® RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Es wird empfohlen für die trockenen Genitalabstriche 400 µl PCR-Wasser in ein Präparationsröhrchen vorzulegen. Den Abstrichtupfer in das Wasser tauchen, ausdrücken und den Stab abbrechen oder abschneiden. Das Präparationsröhrchen dicht verschließen, kurz vortexen und die weitere DNA-Präparation nach Herstellerangabe des DNA-Extraktionskits oder DNA-Extraktionssystems durchführen ([siehe auch Maxwell® RSC Kurzanleitung R101](#)).

Der RIDA®GENE STI Mycoplasma Panel Test enthält eine **Internal Control DNA**, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die **Internal Control DNA** kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die **Internal Control DNA** nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der **Internal Control DNA** dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die Internal Control DNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der Internal Control DNA während der Extraktion eingesetzt werden. Die Internal Control DNA soll dem Proben-Lysispuffer-Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

8.2 DNA-Präparation aus Urin

Für die DNA-Präparation aus Urin wird ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionskit (z.B. RIDA® Xtract (R-Biopharm)) oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell® RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten (**siehe auch Maxwell® RSC Kurzanleitung R100**).

Der RIDA®GENE STI Mycoplasma Panel Test enthält eine Internal Control DNA, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die Internal Control DNA kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die Internal Control DNA nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der Internal Control DNA dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die Internal Control DNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der Internal Control DNA während der Extraktion eingesetzt werden. Die Internal Control DNA soll dem Proben-Lysispuffer-Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3, Tab. 4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, die **Taq-Polymerase**, die **Positive Control**, die **No Template Control** und die **Internal Control DNA** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 - 8 °C).

Tab. 3: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Tab. 4: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

Negativkontrolle: 5 µl **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als **Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.**

Proben: 5 µl Eluat zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Positivkontrolle: 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als **Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.**

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab.8).

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 DNA real-time PCR-Profil

Tab. 5: Real-time PCR-Profil für LightCycler® Serie und Rotor-Gene Q

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 6: Real-time PCR-Profil für Mx3005P, ABI 7500 und CFX96™

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

9.3.2 Universal real-time PCR-Profil

Hinweis: Das Universal real-time PCR-Profil für DNA Tests sollte nur verwendet werden, wenn RIDA®GENE DNA und RIDA®GENE RNA real-time PCR Tests in einem Lauf kombiniert werden.

Tab. 7: Universal real-time PCR-Profil für LightCycler® Serie

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 8: Universal real-time PCR-Profil für Mx3005P, ABI 7500, Rotor-Gene Q und CFX96™

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 9: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480II	<i>M. hominis</i>	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICD	533/580	
	<i>U. urealyticum/parvum</i>	533/610	
	<i>M. genitalium</i>	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<i>M. hominis</i>	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICD	540/580	
	<i>U. urealyticum/parvum</i>	540/610	
	<i>M. genitalium</i>	610/670	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>M. hominis</i>	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICD	HEX	
	<i>U. urealyticum/parvum</i>	ROX	
	<i>M. genitalium</i>	Cy5	
ABI 7500	<i>M. hominis</i>	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	
	<i>U. urealyticum/parvum</i>	ROX	
	<i>M. genitalium</i>	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>M. hominis</i>	FAM	-
	ICD	HEX	
	<i>U. urealyticum/parvum</i>	ROX	
	<i>M. genitalium</i>	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>M. hominis</i>	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein
	ICD	Yellow	
	<i>U. urealyticum/parvum</i>	Orange	
	<i>M. genitalium</i>	Red	

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 10, Abb. 1, Abb. 2, Abb. 3).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 Kopien in jedem PCR Lauf eingesetzt.

Tab. 10: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICD Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA *1	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

**1 Ein Ct-Wert für die ICD ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.*

Wenn die Positivkontrolle in dem angegebenen Ct-Bereich nicht positiv ist, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

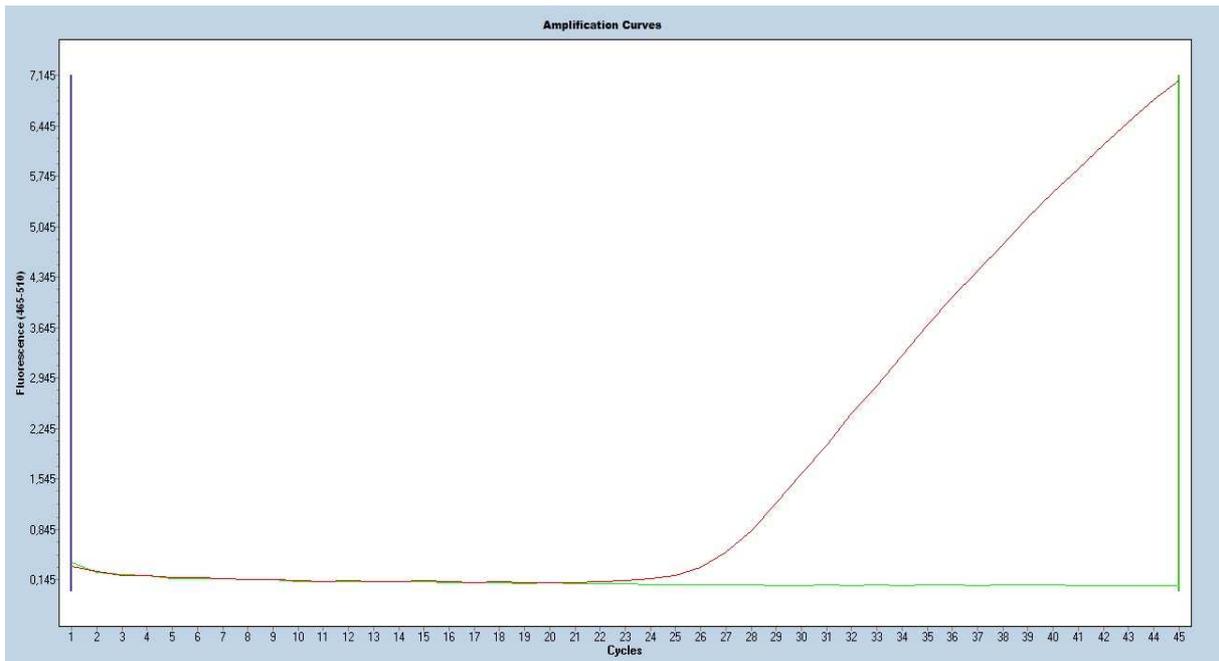


Abb. 1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Mycoplasma hominis*) auf dem LightCycler® 480II

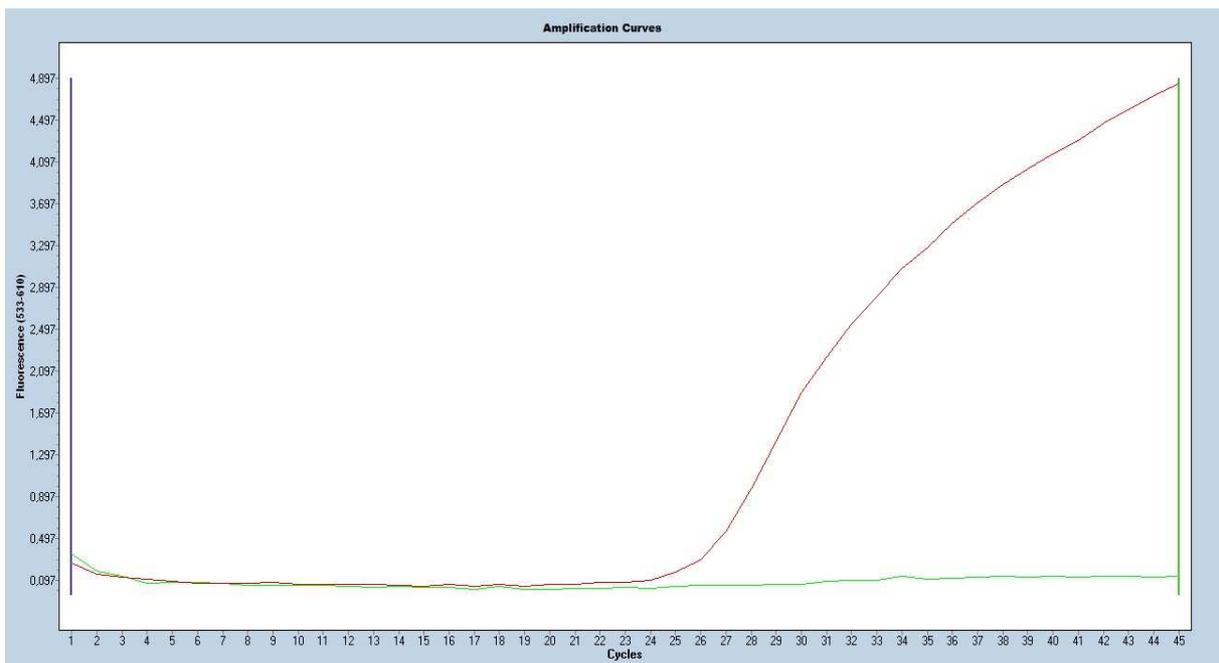


Abb. 2: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Ureaplasma urealyticum/parvum*) auf dem LightCycler® 480II

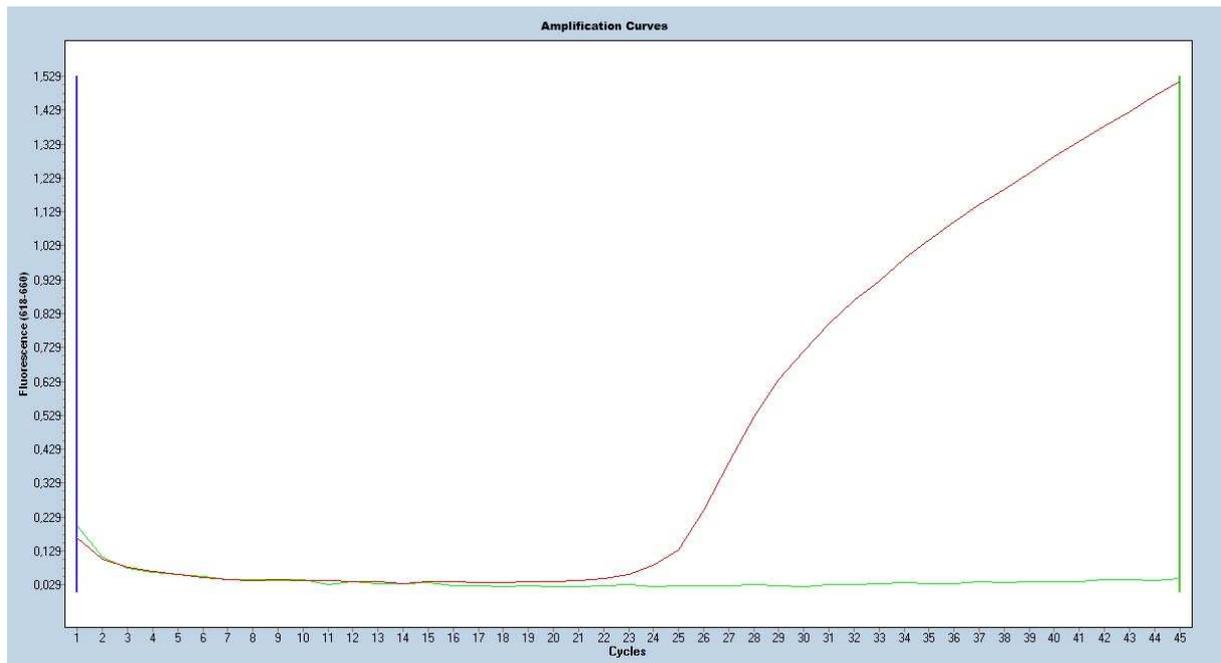


Abb. 3: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Mycoplasma genitalium*) auf dem LightCycler® 480II

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tab. 11.

Tab. 11: Probenauswertung

Nachweis von				
<i>M. hominis</i>	<i>U. urealyticum/parvum</i>	<i>M. genitalium</i>	ICD	Ergebnis
positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	<i>M. hominis</i> nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	<i>U. urealyticum/parvum</i> nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	<i>M. genitalium</i> nachweisbar
positiv	positiv	negativ	positiv/negativ	<i>M. hominis</i> und <i>U. urealyticum/parvum</i> nachweisbar
positiv	negativ	positiv	positiv/negativ	<i>M. hominis</i> und <i>M. genitalium</i> nachweisbar
negativ	positiv	positiv	positiv/negativ	<i>U. urealyticum/parvum</i> und <i>M. genitalium</i> nachweisbar
positiv	positiv	positiv	positiv/negativ	<i>M. hominis</i> , <i>U. urealyticum/parvum</i> und <i>M. genitalium</i> nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	Zielgene nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	Ungültig

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt.

Eine Probe wird ebenfalls positiv bewertet ist, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation, jedoch keine Amplifikation für die Internal Control DNA im Nachweissystem zeigt. Der Nachweis der Internal Control DNA ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der internen Amplifikationskontrolle führen können.

Eine Probe wird negativ bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation, aber die Internal Control DNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der Internal Control DNA ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA im Nachweissystem keine Amplifikation zeigt. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

12. Grenzen der Methode

1. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. Dieser Test ist nur für humane Genitalabstriche und Urin validiert.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®GENE STI Mycoplasma Panel zu falsch negativen Ergebnissen führen.
6. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro* diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
7. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die Zielgene (16S-rRNA, IGS) vorhanden sind.
8. Mucin kann bei Verwendung von Genitalabstrichen bereits in geringen Mengen interferierende Eigenschaften aufweisen (Validierung erfolgte im U.urealyticum/parvum-Kanal).

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA®GENE STI Mycoplasma Panel multiplex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 10 DNA-Kopien/Reaktion.

Die folgende Abbildungen 4, 5 und 6 zeigen jeweils eine Verdünnungsreihe von *M. hominis*, *U. urealyticum/parvum* und *M. genitalium* ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II.

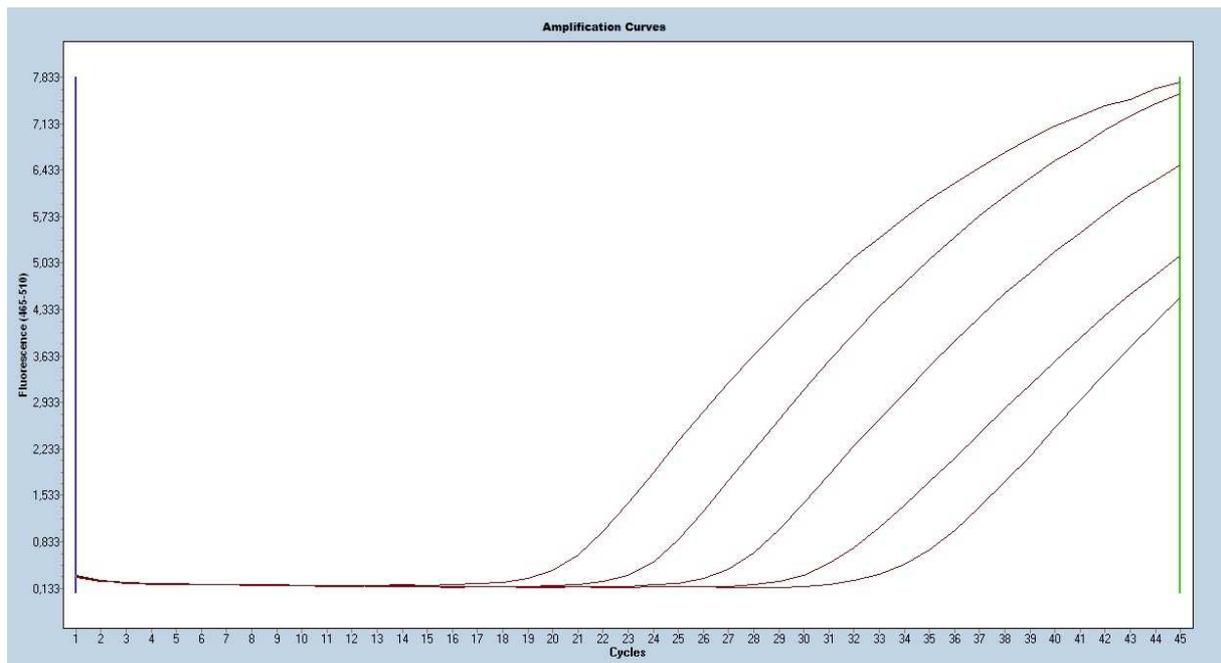


Abb. 4: Verdünnungsreihe *Mycoplasma hominis* ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II

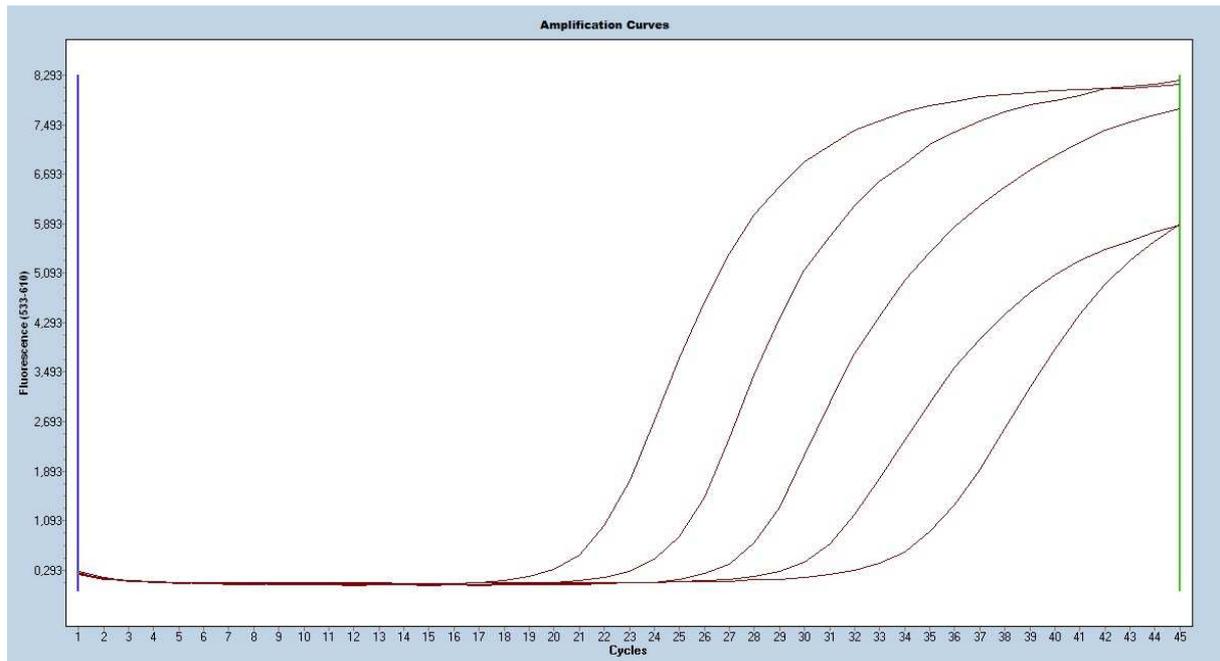


Abb. 5: Verdünnungsreihe *Ureaplasma urealyticum/parvum* ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II

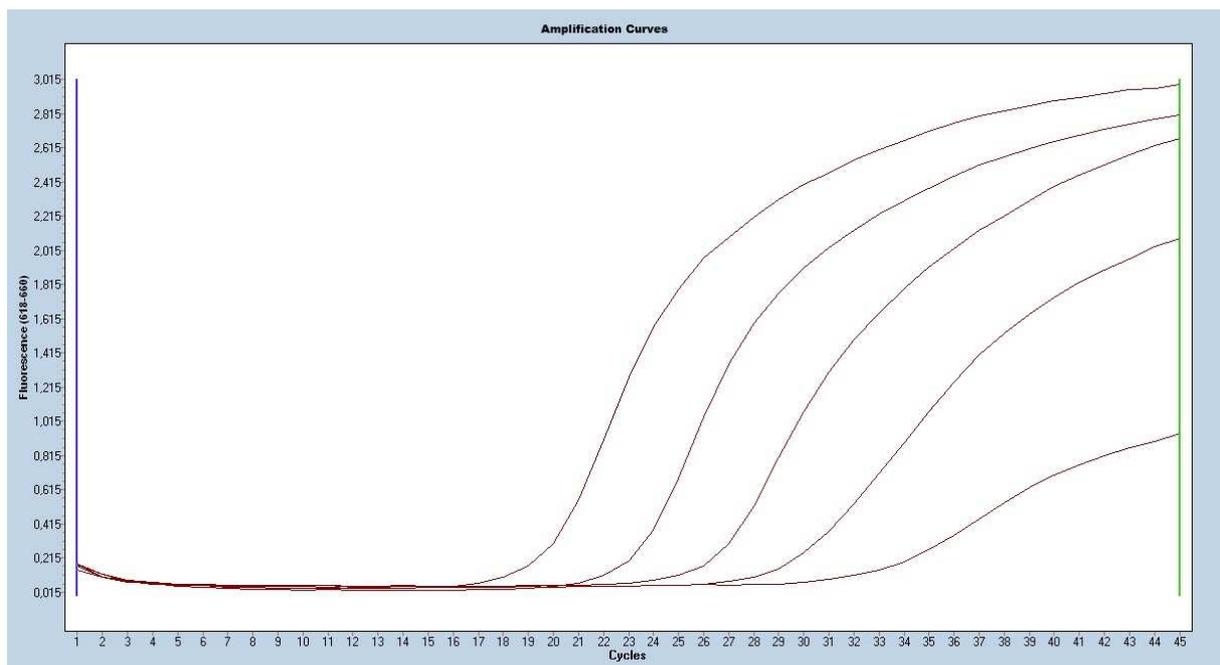


Abb. 6: Verdünnungsreihe *Mycoplasma genitalium* ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, DNA-Extraktion und DNA-Gehalt.

13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE STI Mycoplasma Panel multiplex real-time PCR ist spezifisch für *M. hominis*, *U. urealyticum/parvum* und *M. genitalium*. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 12):

Tab. 12: Kreuzreaktivitätstestung

<i>Candida albicans</i>	-	HSV 1	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	HSV 2	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	HPV 6b	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	HPV 16	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
<i>E. coli</i>	-	HPV 18	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Mycoplasma fermentans</i>	-	<i>Serratia marcescens</i>	-		

13.3 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA®GENE STI Mycoplasma Panel multiplex real-time PCR wurde mit verschiedenen *Mycoplasma*- und *Ureaplasma*-Subtypen untersucht (s. Tabelle 13). Folgende Subtypen wurden mit der RIDA®GENE STI Mycoplasma Panel multiplex real-time PCR nachgewiesen.

Tab. 13: Analytische Reaktivitätstestung

<i>Mycoplasma</i>			
<i>Mycoplasma hominis</i>			
Serotyp 3	+	Serotyp 5	+
<i>Mycoplasma genitalium</i>			
<i>Mycoplasma genitalium</i>	+		
<i>Ureaplasma</i>			
<i>Ureaplasma urealyticum</i> (Serovar 8)	+	<i>Ureaplasma parvum</i> (Serovar 1)	+

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2019-07-23	<ul style="list-style-type: none"> Generelle Überarbeitung 4. Packungsinhalt 5. Reagenzien und ihre Lagerung 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 7. Vorsichtsmaßnahmen 8. Sammlung und Lagerung der Proben 9. Testdurchführung 10. Qualitätskontrolle 12. Grenzen der Methode 13. Leistungsmerkmale 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	<i>In-vitro</i> Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

Nicht zutreffend

16. Literatur

1. Waites *et al.* Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. Clin Microbiol Rev. 2005. 18(4): 757–789.
2. Ljubin-Sternak *et al.* Chlamydia trachomatis and Genital Mycoplasmas: Pathogens with an Impact on Human Reproductive Health. Journal of Pathogens, 2014. 2014:183167.
3. Advameg, Inc. Human Diseases and Conditions. 2019. <http://www.humanillnesses.com/Infectious-Diseases-He-My/Mycoplasma-Infections.html> (accessed 31.07.2019)
4. McGowin *et al.* Mycoplasma genitalium: an emerging cause of sexually transmitted disease in women. PLoS Pathog. 2011. 7(5).
5. Robertson *et al.* Proposal of Ureaplasma parvum sp. nov. and emended description of Ureaplasma urealyticum (Shepard et al. 1974) Robertson et al. 2001. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2002, 52, 587–597.