



RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel

REF PG4945



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany
Phone: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



Deutsch	3
English.....	25
Español.....	45
Français.....	67
Italiano	89

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

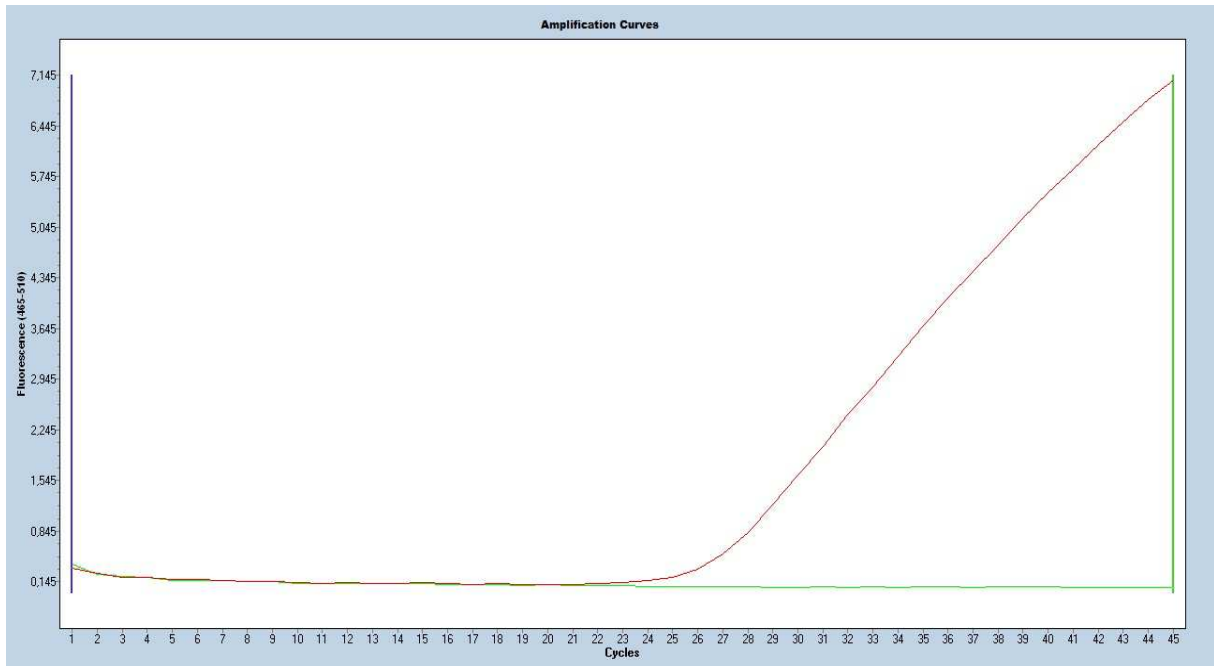


Abb. 1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Mycoplasma hominis*) auf dem LightCycler® 480II

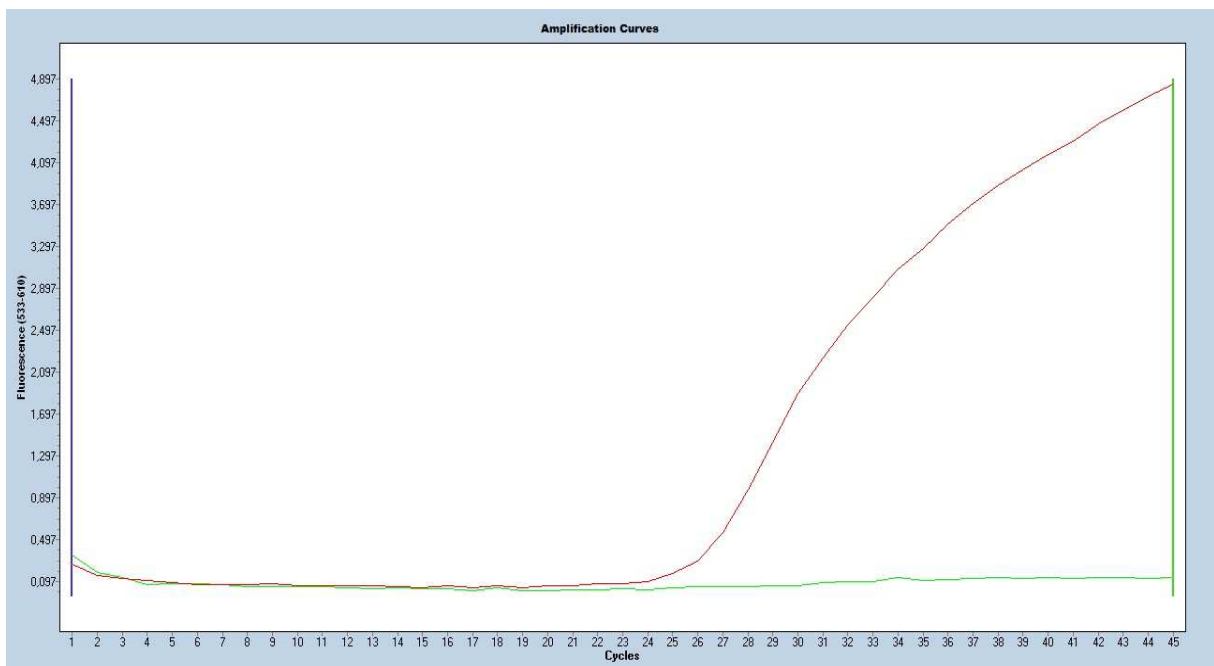


Abb. 2: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Ureaplasma urealyticum/parvum*) auf dem LightCycler® 480II

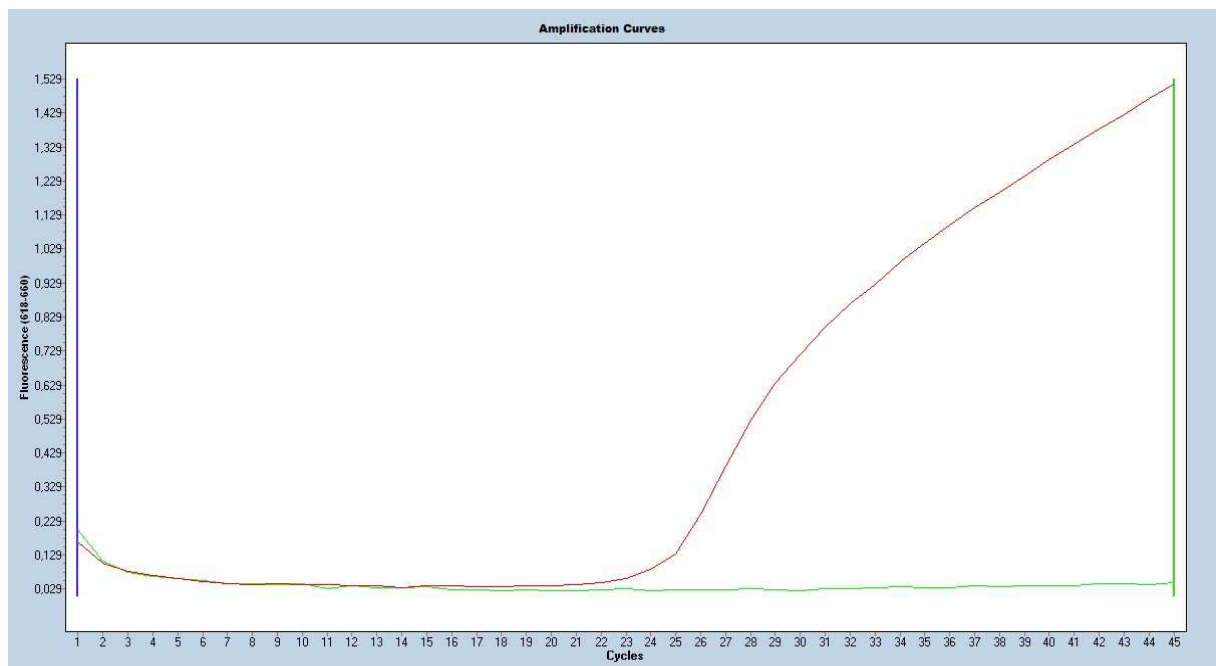


Abb. 3: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Mycoplasma genitalium*) auf dem LightCycler® 480II

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.

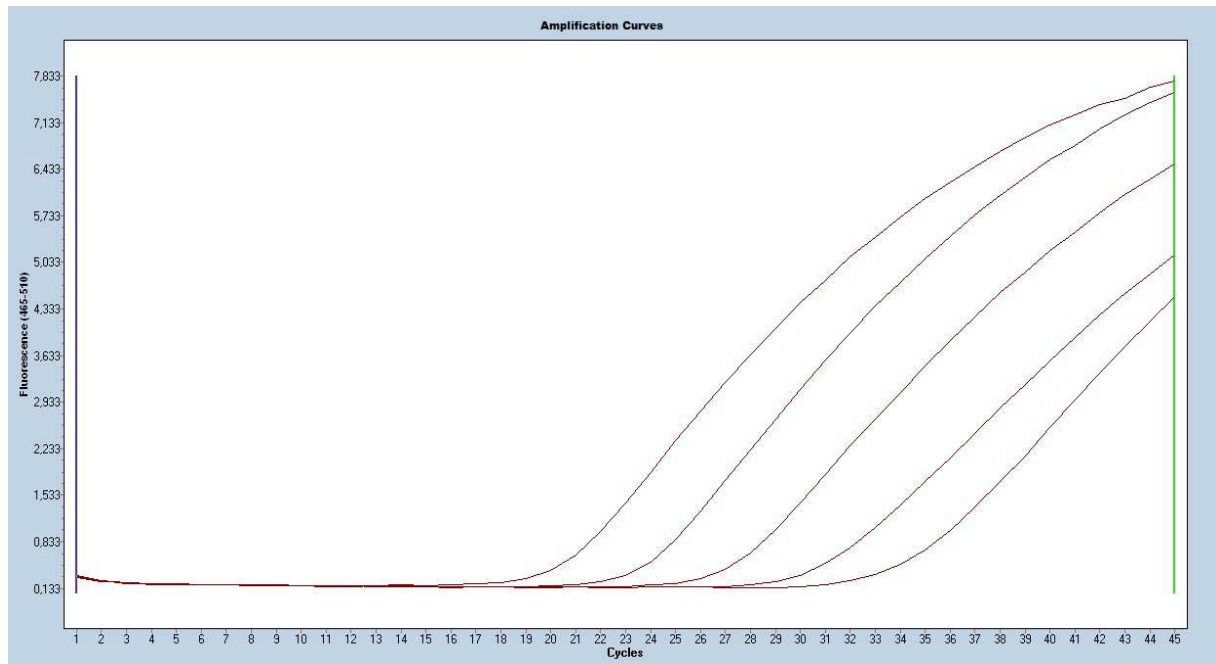


Abb. 4: Verdünnungsreihe *Mycoplasma hominis* ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

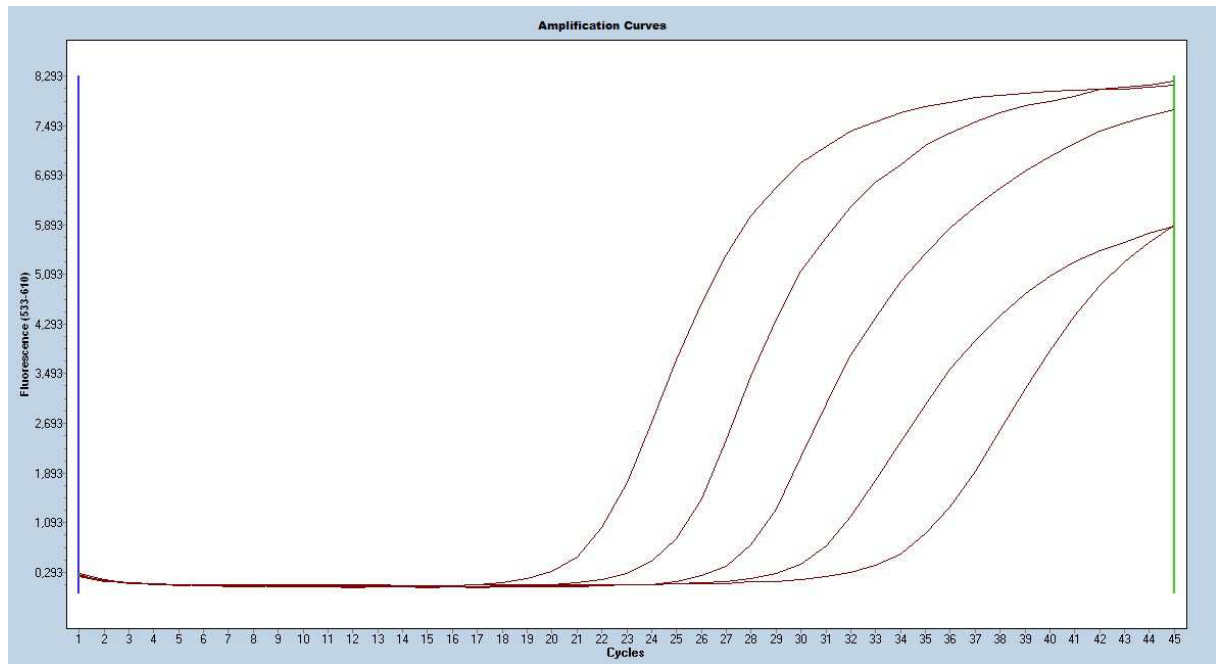


Abb. 5: Verdünnungsreihe *Ureaplasma urealyticum/parvum* ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

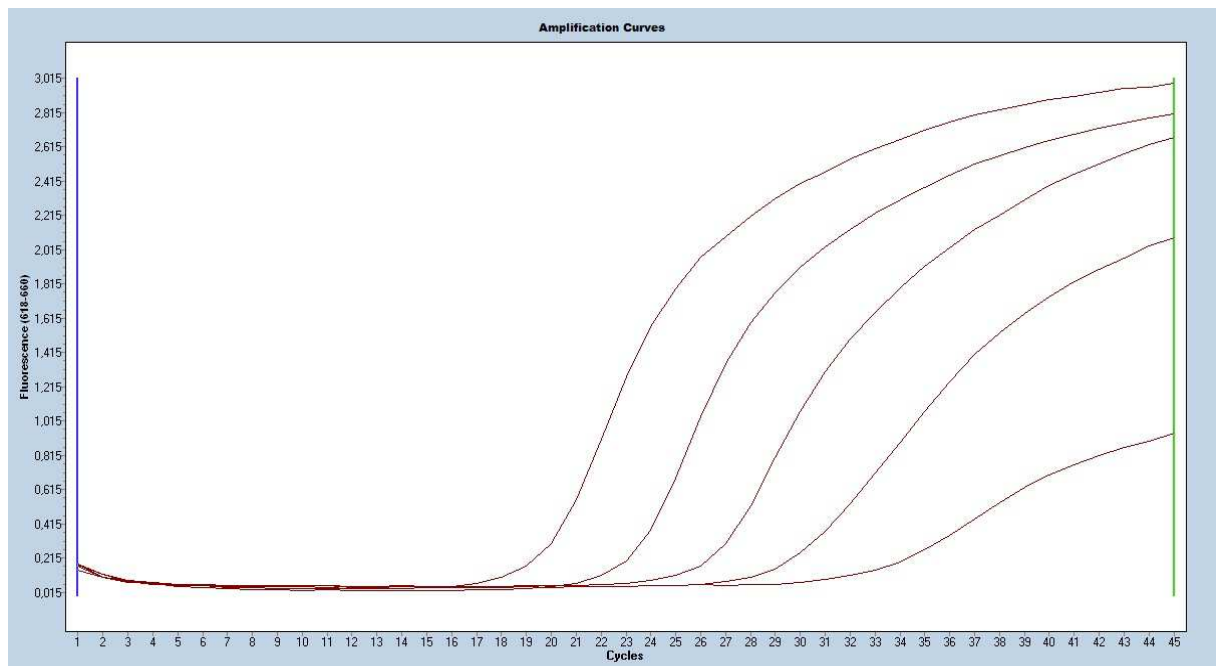


Abb. 6: Verdünnungsreihe *Mycoplasma genitalium* ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

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>	-	Treponema pallidum	-
<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.

RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel

REF PG4945

1. Intended use

For *in-vitro* diagnostic use. RIDA[®]GENE STI Mycoplasma Panel is a multiplex real-time PCR for the direct, qualitative detection of *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum/parvum* from human genital swabs and urine.

The RIDA[®]GENE STI Mycoplasma Panel multiplex real-time PCR is intended for use as an aid in diagnosis of urinary tract infections or infections of the genital area caused by *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum/parvum*.

2. Summary and explanation of the test

Mycoplasma species may persist as part of the normal human flora of the respiratory system or the genital area.¹ Of the mycoplasma species mainly existing in the genital area, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* are, among others, described as pathogenic.^{1,2}

Mycoplasma hominis (*M. hominis*) mainly colonizes the genital tract of sexually active men and women, however most of the *M. hominis* described infections have been diagnosed in woman.² *M. hominis* is associated with pelvic inflammatory disease (PID) and may cause infections during or after pregnancy, such as endometritis or neonatal pneumonia.¹ Common symptoms for infections with *M. hominis* include e.g. frequent urination, yellow discharge or dysuria.^{1,3}

Globally, the prevalence of *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*) ranges between 1- 4 % for men and 1 – 6.4 % for women. In men, *M. genitalium* may result in non-specific urethritis and is the second most common cause after *Chlamydia trachomatis*. About 30 % of persistent urethritis is linked to *M. genitalium*. In women, *M. genitalium* infections may lead to cervicitis, endometritis, urethritis or pelvic inflammatory disease (PID).^{1,4}

Ureaplasma urealyticum (*U. urealyticum*) and *Ureaplasma parvum* (*U. parvum*) are parasitic, gram-negative bacteria which can be part of the urogenitalflora of men and women. In 2002, the earlier existing nomenclature of 14 *U. urealyticum* serovars has been updated, so that serovar 1, 3, 6 and 14, which groups to Parvo biovar (Biovar 1), are now listed as separate species (*U. parvum*). Serovars 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11,

12 and 13 belong to T960 biovar (Biovar 2) and therefore are listed as *U. urealyticum*.⁵ In women, *U. urealyticum* prevalently causes pelvic inflammatory disease (PID) and *Ureaplasma* colonizes the vaginal flora of up to 50 % of pregnant women. During pregnancy *Ureaplasma* may be transmitted to the child, which can lead to pneumonia or diseases of the central nervous system.¹

3. Test principle

The RIDA[®]GENE STI Mycoplasma Panel is a multiplex real-time PCR for the direct, qualitative detection of *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum/parvum* from genital swabs, as well as from urine.

After DNA isolation, amplification of the gene fragment (if present) specific for *Mycoplasma hominis* (16S-rRNA), *Mycoplasma genitalium* (IGS) and *Ureaplasma urealyticum/parvum* (16S-rRNA) occurs. The amplified target is detected with hydrolysis probes, which are labeled at one end with a quencher and at the other end with a fluorescent reporter dye (fluorophore). In the presence of a target the probes hybridize to the amplicons. During the extension step the **Taq-Polymerase** breaks the reporter-quencher proximity. The reporter emits a fluorescent signal which is detected by the optical unit of a real-time PCR instrument. The fluorescence signal increases with the amount of formed amplicons. The RIDA[®]GENE STI Mycoplasma assay contains an **Internal Control DNA** (ICD) as an internal control of sample preparation procedure and/or to determine possible PCR inhibition.

4. Reagents provided

Tab. 1: Reagents provided (Reagents provided in the kit are sufficient for 100 determinations)

Kit Code	Reagent	Amount		Lid Color
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	yellow
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	red
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	white
P	Positive Control	1x	200 µl	blue

5. Storage instructions

- Protect all reagents from light and store at -20 °C. All reagents can be used **unopened** until the expiration date. After expiry the quality guarantee is no longer valid.
- Carefully thaw and fully defrost reagents before using (e.g. in a refrigerator at 2 - 8 °C).
- Reagents can sustain up to 20 freeze/thaw cycles without influencing the assay performance (e.g. after the first thawing separate it in aliquots and freeze immediately).
- During PCR preparation all reagents should be stored cold in an appropriate way (2 – 8 °C).

6. Additional necessary reagents and necessary equipment

The RIDA®GENE STI Mycoplasma Panel multiplex real-time PCR assay is suitable for use with following extraction platforms and real-time PCR instruments:

Tab. 2: Necessary equipment

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

Note: Only use 0.1 ml tubes on the Rotor-Gene Q (QIAGEN).

If you want to use other extraction platforms or real-time PCR instruments please contact R-Biopharm at mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) for use with the LightCycler® 480II **and the LightCycler® 480 z.**
- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foil)
- Centrifuge with a rotor for the reaction vials
- Vortexer
- Pipettes (0.5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves
- **PCR water (nuclease-free)**

7. Precautions for users

For *in vitro* diagnostic use.

This test must only be carried out by trained laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories have to be followed. The instruction manual for the test procedure has to be followed. Do not pipet samples or reagents by mouth. Avoid contact with bruised skin or mucosal membranes. During handling reagents or samples, wear appropriate safety clothing (appropriate gloves, lab coat, safety goggles) and wash your hands after finishing the test procedure. Do not smoke, eat or drink in areas where samples or reagents are being used.

- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- Samples must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials being exposed to the samples and have to be handled according to the national safety regulations.
- Do not use the kit after the expiration date.

All reagents and materials used have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulations for disposal.

For more details see Safety Data Sheets (SDS) at www.r-biopharm.com.

8. Collection and storage of samples

8.1 DNA preparation from dry genital swabs

For DNA isolation from dry genital swabs, use a commercially available DNA isolation kit (e.g. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) or DNA extraction system (e.g. Maxwell[®] RSC (Promega)). Extract DNA according to the manufacturer's instructions. To isolate DNA from dry swabs the following procedure is recommended: Add 400 µl PCR water into a preparation tube. Insert the swab into the water, squeeze it and cut or break the swab stem. Cap the preparation tube tightly, vortex shortly and continue according to manufacturer's instruction of the DNA extraction kit or DNA extraction system (see also [Maxwell[®] RSC Application ER101](#)).

The RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel assay contains an Internal Control DNA that detects PCR inhibition, monitors reagent integrity and confirms that nucleic acid extraction was sufficient. The Internal Control DNA can either be used as PCR inhibition control or as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control.

If the Internal Control DNA is used only as a PCR inhibition control, 1 µl of the Internal Control DNA should be added to the Master- Mix (see Tab.4).

If the Internal Control DNA is used as an extraction control for the sample preparation procedure **and** as PCR inhibition control, 20 µl of the Internal Control DNA has to be added during extraction procedure.

The Internal Control DNA should always be added to the specimen-lysis buffer mixture and must **not** be added directly to the specimen. We also recommend to add 1 µl of the Internal Control DNA to the negative control and positive control PCR Mix.

8.2 DNA preparation from urine

For DNA isolation from urine, use a commercially available DNA isolation kit (e.g. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) or DNA extraction system (e.g. Maxwell[®] RSC (Promega)). Extract DNA according to the manufacturer's instructions (see also Maxwell[®] RSC Application ER100).

The RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel assay contains an Internal Control DNA that detects PCR inhibition, monitors reagent integrity and confirms that nucleic acid extraction was sufficient. The Internal Control DNA can either be used as PCR inhibition control or as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control.

If the Internal Control DNA is used only as a PCR inhibition control, 1 µl of the Internal Control DNA should be added to the Master- Mix (see Tab.4).

If the Internal Control DNA is used as an extraction control for the sample preparation procedure **and** as PCR inhibition control, 20 µl of the Internal Control DNA has to be added during extraction procedure.

The Internal Control DNA should always be added to the specimen-lysis buffer mixture and must **not** be added directly to the specimen. We also recommend to add 1 µl of the Internal Control DNA to the negative control and positive control PCR Mix.

9. Test procedure

9.1 Master-Mix preparation

Calculate the total number of PCR reactions (sample and control reactions) needed. One positive control and one negative control must be included in each assay run.

We recommend calculating an additional volume of 10 % to compensate imprecise pipetting (see Tab. 3, Tab. 4). Thaw, mix gently and briefly centrifuge the **Reaction Mix**, the **Taq-Polymerase**, the **Positive Control**, the **No Template Control** and the **Internal Control DNA** before using. Keep reagents appropriately cold during working step (2 - 8 °C).

Tab. 3: Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master-Mix (ICD as extraction and PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Taq-Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

Tab. 4: Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master-Mix (ICD only as PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
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
	Total	21.0 µl	231.0 µl

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

9.2 Preparation of the PCR-Mix

Pipette 20 µl of the Master-Mix in each reaction vial (tube or plate).

Negative control: Add 5 µl **No Template Control** to the pre-pipetted Master-Mix.

Note: If the **Internal Control DNA** is used as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the PCR-Mix of the negative control.

Sample: Add 5 µl eluate to the pre-pipetted Master-Mix.

Positive control: Add 5 µl **Positive Control** to the pre-pipetted Master-Mix.

Note: If the **Internal Control DNA** is used as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the PCR-Mix of the positive control.

Cover tubes or plate. Spin down and place in the real-time PCR instrument. The PCR reaction should be started according to the PCR instrument set-up (see Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

9.3 PCR instrument set-up

9.3.1 DNA real-time PCR profile

Tab. 5: Real-time PCR profile for LightCycler® series and Rotor-Gene Q

Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

Tab. 6: Real-time PCR profile for Mx3005P, ABI 7500 and CFX96™

Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

9.3.2 Universal real-time PCR profile

Note: The universal real-time PCR profile should only be used for DNA assays when combining RIDA® GENE DNA and RIDA® GENE RNA real-time PCR assays in one run.

Tab. 7: Universal real-time PCR profile for LightCycler® series

<u>Reverse Transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

Tab. 8: Universal real-time PCR profile for Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q and CFX96™

<u>Reverse Transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

9.4 Detection channel set-up

Tab. 9: Selection of appropriate detection channels

Real-time PCR instrument	Detection	Detection channel	Note
Roche LightCycler® 480II	<i>M. hominis</i>	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required
	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) is required
	ICD	540/580	
	<i>U. urealyticum/parvum</i>	540/610	
	<i>M. genitalium</i>	610/670	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>M. hominis</i>	FAM	Check that reference option is none
	ICD	HEX	
	<i>U. urealyticum/parvum</i>	ROX	
	<i>M. genitalium</i>	Cy5	
ABI 7500	<i>M. hominis</i>	FAM	Check that passive reference option ROX is 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	The gain settings have to be set to 5, according to the default settings
	ICD	Yellow	
	<i>U. urealyticum/parvum</i>	Orange	
	<i>M. genitalium</i>	Red	

10. Quality control

The analysis of the samples is done by the software of the used real-time PCR instrument according to the manufacturer's instructions. Negative control and positive control have to show correct results (see Tab. 10, Fig. 1) in order to determine a valid run.

The **Positive Control** has a concentration of 10^3 copies/ μ l. In each PCR run it is used in a total amount of 5×10^3 copies.

Tab. 10: For a valid run, the following conditions must be met:

Sample	Assay result	ICD Ct	Target Ct
Positive control	Positive	NA * ¹	See Quality Assurance Certificate
Negative control	Negative	Ct > 20	0

*¹ No Ct value is required for the ICD to make a positive call for the positive control.

If the positive control is not positive within the specified Ct range but the negative control is valid, prepare all new reactions including the controls.

If the negative control is not negative but the positive control is valid prepare all new reactions including the controls.

If the required criteria are not met, following items have to be checked before repeating the test:

- Expiry of the used reagents
- Functionality of the used instrumentation
- Correct performance of the test procedure

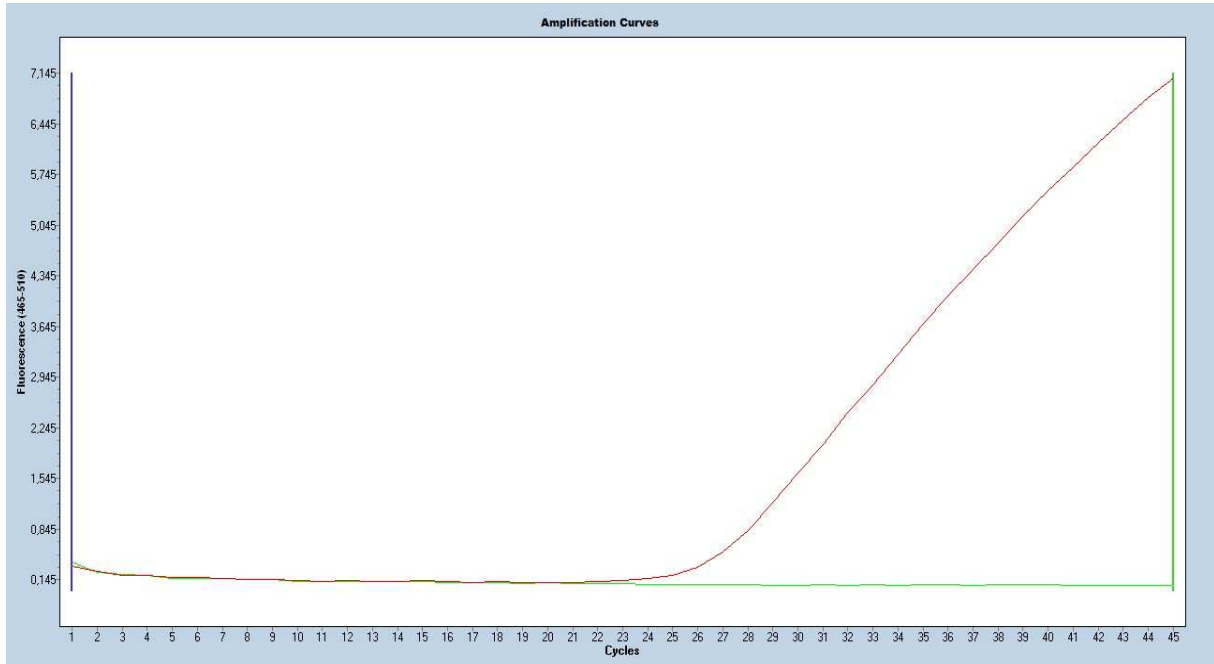


Fig. 1: Correct run of the positive control (red) and negative control (green) (*Mycoplasma hominis*) on the LightCycler® 480II

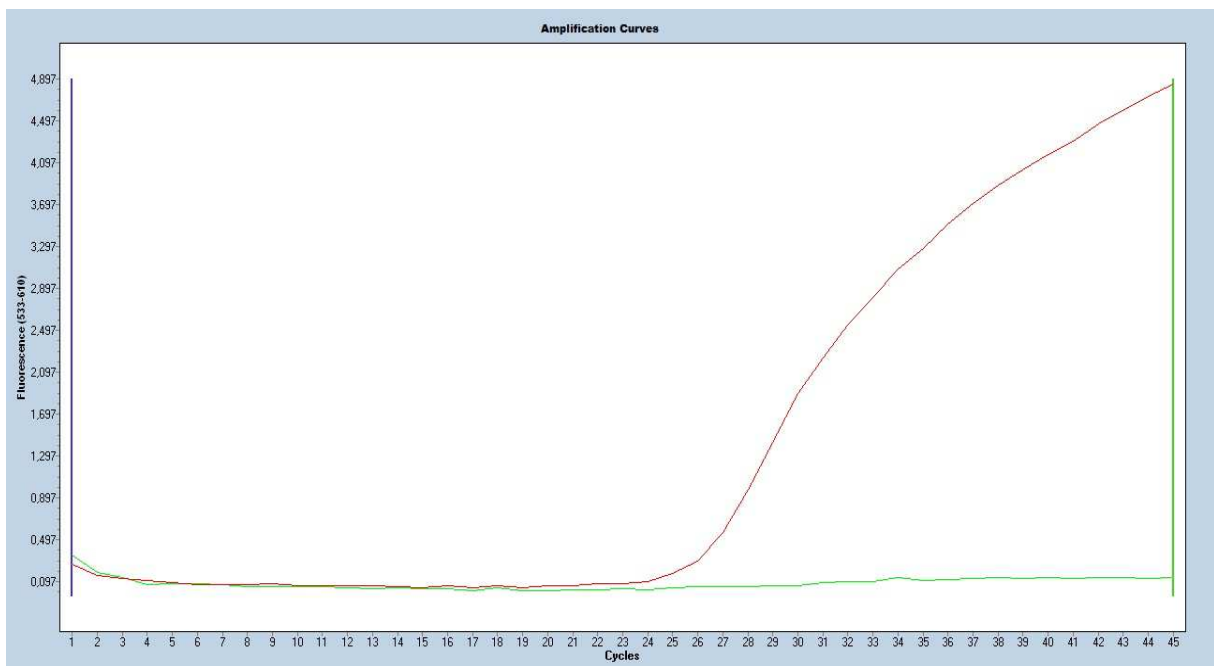


Fig. 2: Correct run of the positive control (red) and negative control (green) (*Ureaplasma urealyticum/parvum*) on the LightCycler® 480II

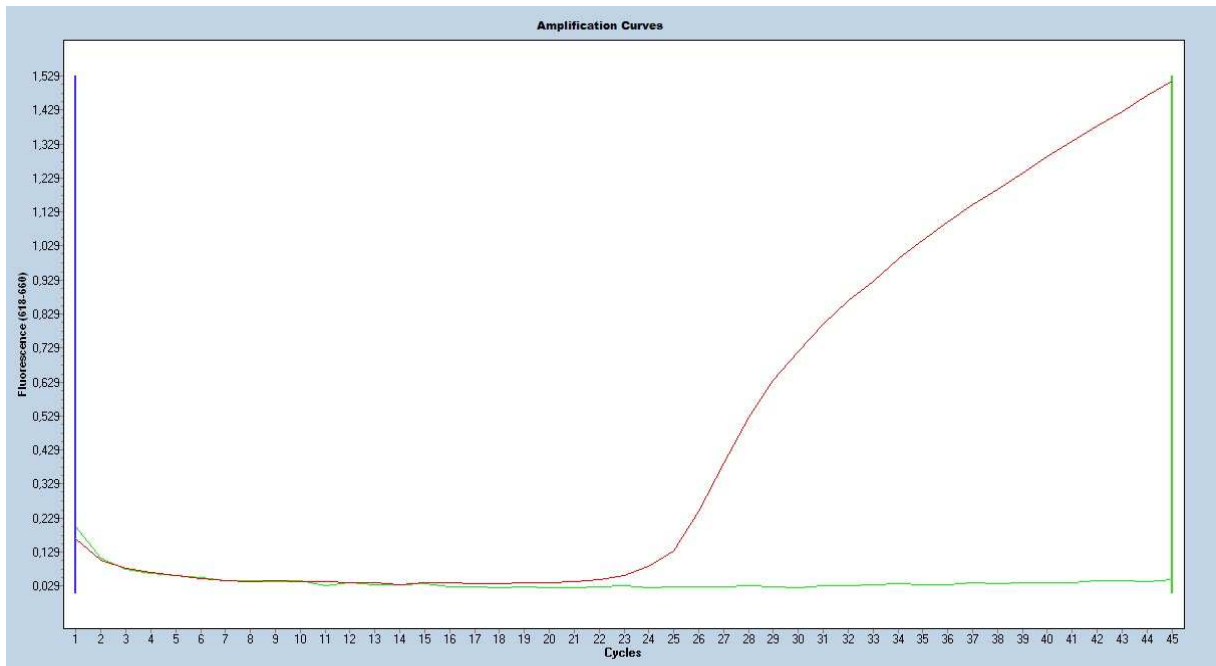


Fig. 3: Correct run of the positive control (red) and negative control (green) (*Mycoplasma genitalium*) on the LightCycler® 480II

11. Result interpretation

The result interpretation is done according to Tab. 11.

Tab. 11: Sample interpretation

Target genes			ICD	Result
<i>M. hominis</i>	<i>U. urealyticum/parvum</i>	<i>M. genitalium</i>		
positive	negative	negative	positive/negative	<i>M. hominis</i> detected
negative	positive	negative	positive/negative	<i>U. urealyticum/parvum</i> detected
negative	negative	positive	positive/negative	<i>M. genitalium</i> detected
positive	positive	negative	positive/negative	<i>M. hominis</i> and <i>U. urealyticum/parvum</i> detected
positive	negative	positive	positive/negative	<i>M. hominis</i> and <i>M. genitalium</i> detected
negative	positive	positive	positive/negative	<i>U. urealyticum/parvum</i> and <i>M. genitalium</i> detected
positive	positive	positive	positive/negative	<i>M. hominis</i> , <i>U. urealyticum/parvum</i> and <i>M. genitalium</i> detected
negative	negative	negative	positive	Target genes not detected
negative	negative	negative	negative	Invalid

A sample is evaluated positive, if the sample DNA and the Internal Control DNA show an amplification signal in the detection system.

A sample is also evaluated positive, if the sample DNA shows an amplification signal but none for the Internal Control DNA in the detection system. The detection of the internal amplification control is not necessary because high concentrations of the amplicon can cause a weak or absent signal of the Internal Control DNA.

A sample is evaluated negative, if the sample DNA shows no amplification signal, but an amplification signal for the Internal Control DNA in the detection system. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the detection of the Internal Control DNA.

A sample is invalid, if the sample DNA and Internal Control DNA show no amplification signal in the detection system. The sample contains a PCR inhibitor or a failure occurred in the extraction procedure. The extracted sample needs to be further diluted with PCR water (1:10) and amplified again, or the isolation and purification of the sample has to be improved.

12. Limitations of the method

1. The result of molecular analysis should not lead to the diagnosis, but always be considered in the context of medical history and symptoms of the patient.
2. This assay is only validated for human genital swabs and urine samples.
3. Inappropriate specimen collection, transport, storage and processing or a pathogen load in the specimen below the analytical sensitivity can result in false negative results.
4. The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
5. Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new variants resulting in a false negative result with the RIDA[®]GENE STI Mycoplasma Panel assay.
6. As with all PCR based *in vitro* diagnostic tests, extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
7. A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. However, a positive result is indicative for the presence of the target gene (16S-rRNA, IGS).
8. In case genital swabs are used, Mucin may show an interfering effect already in small quantities (validated in *U. urealyticum/parvum* channel).

13. Performance characteristics

13.1 Analytical sensitivity

The RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel multiplex real-time PCR has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction.

The following figures 4, 5, and 6 show a dilution series of *M. hominis*, *U. urealyticum/parvum* and *M. genitalium* (each $10^5 - 10^1$ DNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II.

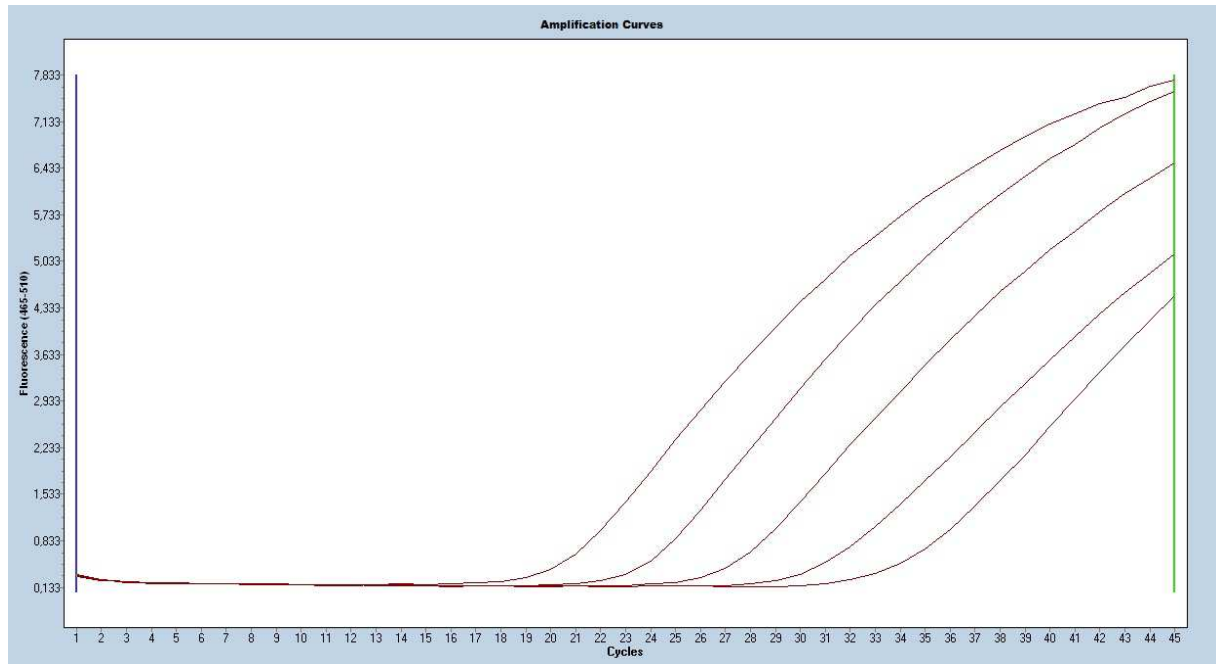


Fig. 4: Dilution series *Mycoplasma hominis* ($10^5 - 10^1$ DNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II

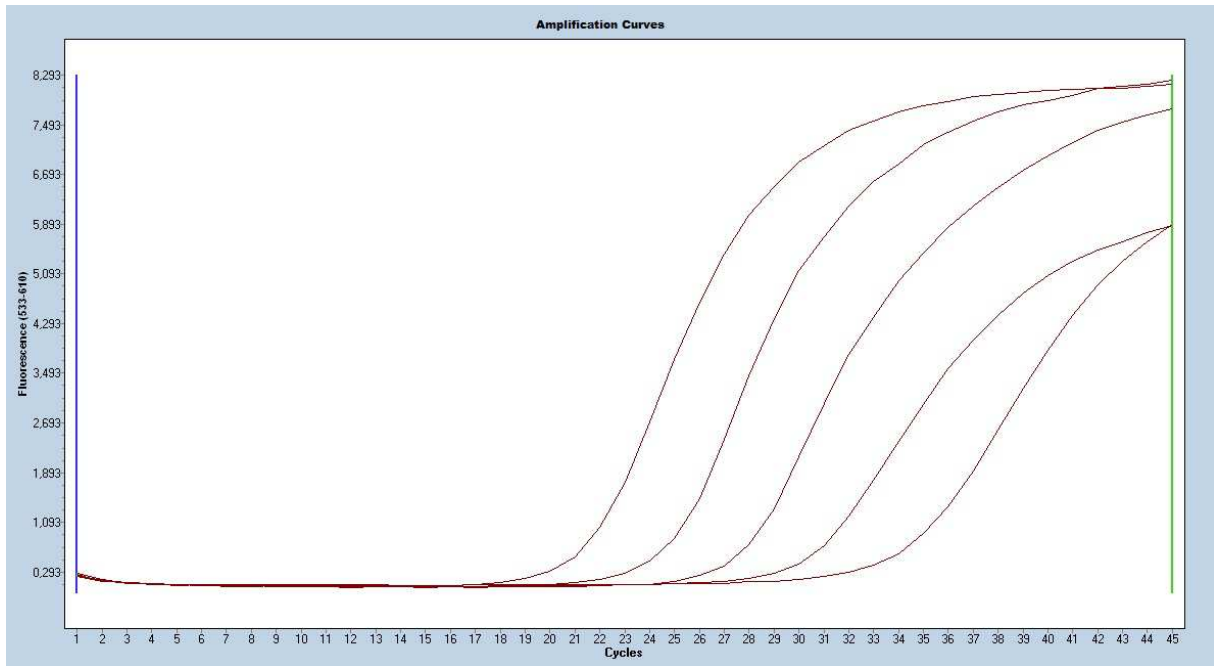


Fig. 5: Dilution series *Ureaplasma urealyticum/parvum* ($10^5 - 10^1$ DNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II

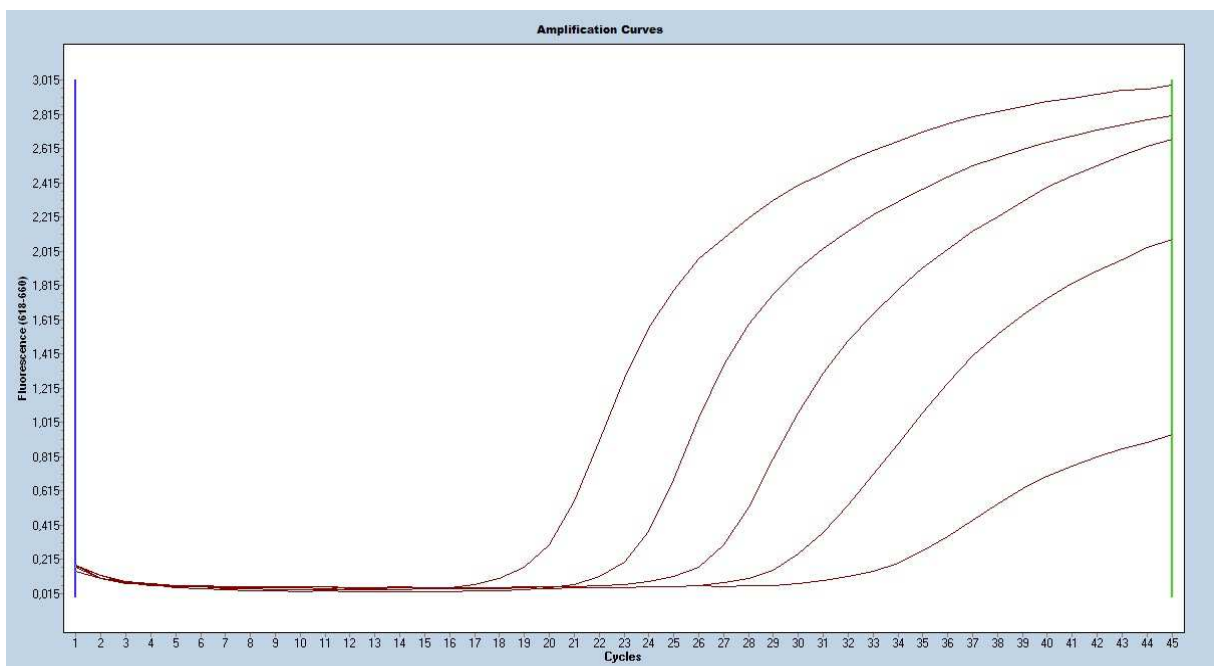


Fig. 5: Dilution series *Mycoplasma genitalium* ($10^5 - 10^1$ DNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II

The detection limit of the whole procedure depends on the sample matrix, DNA extraction and DNA concentration.

13.2 Analytical specificity

The analytical specificity of the RIDA[®]GENE STI Mycoplasma Panel multiplex real-time PCR is specific for *M. hominis*, *U. urealyticum/parvum* and *M. genitalium*. No cross-reaction could be detected for the following species (see Tab. 12):

Tab. 12: Cross-reactivity testing

<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>	-	Treponema pallidum	-
<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 Analytical reactivity

The reactivity of the RIDA[®]GENE STI Mycoplasma multiplex real-time PCR was evaluated against multiple *Mycoplasma* and *Ureaplasma* subtypes (see Tab. 13). The subtypes listed below were detected by the RIDA[®]GENE STI Mycoplasma Panel multiplex real-time PCR assay.

Tab. 13: Analytical reactivity testing










<i>Mycoplasma</i>			
<i>Mycoplasma hominis</i>			
Serotype 3	+	Serotype 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. Version history

Version number	Chapter and designation
2019-07-23	General revision 4. Reagents provided 5. Storage instructions 6. Additional necessary reagents and necessary equipment 7. Precautions for users 8. Collection and storage 9. Test procedure 10. Quality control 12. Limitations of the method 13. Performance characteristics 14. Version history 15. Explanation of symbols

15. Explanation of symbols

General symbols

	For <i>in vitro</i> diagnostic use
	Consult instructions for use
	Lot number
	Expiry
	Store at
	Article number
	Number of tests
	Date of manufacture
	Manufacturer

Testspecific symbols

Not applicable

16. Literature

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.

RIDA® GENE STI Mycoplasma Panel

REF PG4945

1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA® GENE STI Mycoplasma Panel es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección directa y cualitativa de *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* y *Ureaplasma urealyticum/parvum* a partir de frotis genitales y orina humanos.

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE STI Mycoplasma Panel está concebido como una ayuda para el diagnóstico de infecciones de las vías urinarias o de la zona genital, causadas por *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* y *Ureaplasma urealyticum/parvum*.

2. Resumen y descripción del ensayo

Las especies de *Mycoplasma* pueden persistir como parte de la microbiota humana normal del aparato respiratorio o la zona genital.¹ De las especies de micoplasma que existen principalmente en la zona genital, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* y *Ureaplasma parvum*, entre otras, se describen como patógenas.^{1,2}

Mycoplasma hominis (*M. hominis*) coloniza principalmente el aparato genital de hombres y mujeres sexualmente activos; sin embargo, la mayoría de las infecciones por *M. hominis* descritas se han diagnosticado en mujeres.² *M. hominis* se asocia con la enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) y puede causar infecciones durante o después del embarazo, como endometritis o neumonía neonatal.¹ Los síntomas habituales de las infecciones por *M. hominis* incluyen, p. ej., micción frecuente, flujo de color amarillo o disuria.^{1,3}

En todo el mundo, la prevalencia de *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*) varía de 1 % a 4 % en los hombres y de 1 % a 6,4 % en las mujeres. En los hombres, *M. genitalium* puede ocasionar uretritis inespecífica y es la segunda causa más frecuente después de *Chlamydia trachomatis*. Aproximadamente el 30 % de las uretritis persistentes se asocian con *M. genitalium*. En las mujeres, las infecciones por *M. genitalium* pueden dar lugar a cervicitis, endometritis, uretritis o enfermedad inflamatoria pélvica (EIP).^{1,4}

Ureaplasma urealyticum (*U. urealyticum*) y *Ureaplasma parvum* (*U. parvum*) son bacterias gramnegativas parásitas que pueden formar parte de la microbiota urogenital de hombres y mujeres. En 2002, se actualizó la nomenclatura existente anterior de 14 serotipos de *U. urealyticum*, de manera que los serotipos 1, 3, 6 y 14, que se agrupan en el biotipo Parvo (biotipo 1), ahora se indican como una especie distinta (*U. parvum*). Los serotipos 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 pertenecen al biotipo T960 (biotipo 2) y se indican, por lo tanto, como *U. urealyticum*.⁵ En las mujeres, *U. urealyticum* causa predominantemente enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) y *Ureaplasma* coloniza la microbiota vaginal de hasta el 50 % de las mujeres embarazadas. Durante el embarazo, *Ureaplasma* puede transmitirse al feto y provocar neumonía o enfermedades del sistema nervioso central.¹

3. Principio del ensayo

RIDA[®]GENE STI Mycoplasma Panel es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa de *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum/parvum* a partir de frotis genitales y orina humanos. Después del aislamiento del ADN, se lleva a cabo la amplificación del fragmento génico (si está presente) específico de *Mycoplasma hominis* (ARNr 16S), *Mycoplasma genitalium* (IGS) y *Ureaplasma urealyticum/parvum* (ARNr 16S). La diana amplificada se detecta mediante sondas de hidrólisis, marcadas en un extremo con un extintor de fluorescencia y en el otro con un colorante fluorescente indicador (fluoróforo). En presencia de una diana, las sondas se hibridan a los amplicones. Durante el paso de extensión, la **Taq-Polymerase** rompe la proximidad del indicador-extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta en función de la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA[®]GENE STI Mycoplasma contiene un **Internal Control DNA** (ICD) como control interno del procedimiento de preparación de la muestra o para determinar la posible inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones)

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarillo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rojo
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	naranja
N	No Template Control	1x	450 µl	blanco
P	Positive Control	1x	200 µl	azul

5. Instrucciones de almacenamiento

- Proteja todos los reactivos de la luz y consérvelos a una temperatura de -20 °C. Todos los reactivos **sin abrir** pueden utilizarse hasta la fecha de vencimiento. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Descongele con cuidado y por completo los reactivos antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a 2 - 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 20 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte a la eficacia diagnóstica del ensayo (p. ej., tras la primera descongelación, es conveniente separar en alícuotas y congelar de inmediato).
- Durante la preparación de la PCR, todos los reactivos deben conservarse en frío de forma adecuada (2 °C a 8 °C).

6. Reactivos necesarios no suministrados

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE STI Mycoplasma Panel es adecuado para usarse con las siguientes plataformas de extracción y equipos de PCR en tiempo real:

Tabla 2: Equipo necesario

Plataformas de extracción	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Equipos de PCR en tiempo real	
Roche	LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: Utilice únicamente tubos de 0,1 ml en el Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Si desea utilizar otras plataformas de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm en mdx@r-biopharm.de.

- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler® 480II y el LightCycler® 480 z.
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)
- Centrífuga y rotor para los viales de reacción
- Agitador de vórtex
- Pipetas (0,5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (agua sin nucleasas)

7. Advertencias y precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respete las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Siga las indicaciones del manual de instrucciones para la ejecución de la prueba. No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con piel herida o mucosas. Durante la manipulación de reactivos o muestras, lleve ropa de seguridad adecuada (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lávese las manos al finalizar la ejecución de la prueba. No fume, coma ni beba en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos.

- La extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha deben llevarse a cabo en diferentes salas para evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas, al igual que todos los reactivos y materiales expuestos a las muestras, y deben manipularse según las normativas nacionales de seguridad.
- No utilice el kit después de la fecha de caducidad.

Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso. Consulte las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

Para obtener más información, consultar la hoja de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

8.1 Preparación de ADN a partir de hisopos genitales secos

Para el aislamiento del ADN a partir de hisopos genitales secos, use un kit de aislamiento de ADN (p. ej. RIDA[®] Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ADN (p. ej., Maxwell[®] RSC [Promega]) disponibles en el mercado. Extraiga el ADN siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para aislar el ADN a partir de hisopos secos se recomienda el procedimiento siguiente: Añada 400 µl de agua para PCR a un tubo de preparación. Inserte el hisopo en el agua, apriételo, y corte o rompa la varilla. Tape y apriete bien el tubo de preparación, mezcle en un agitador vórtex brevemente y siga las instrucciones del fabricante del kit de extracción de ADN o del sistema de extracción de ADN (consulte también la **aplicación ER101 del equipo Maxwell[®] RSC**).

El ensayo RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel contiene un **Internal Control DNA** que detecta la inhibición de la PCR, monitorea la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El **Internal Control DNA** puede usarse como control de inhibición de la PCR, o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el **Internal Control DNA** se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control DNA** se usa como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y como control de inhibición de la PCR, se deben agregar 20 µl de **Internal Control DNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control DNA** debe añadirse siempre a la mezcla de búfer de lisado de muestras y **no** directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

8.2 Preparación de ADN a partir de orina

Para el aislamiento del ADN a partir de orina, use un kit de aislamiento de ADN (p. ej. RIDA[®] Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ADN (p. ej., Maxwell[®] RSC [Promega]) disponibles en el mercado. Extraiga el ADN siguiendo las instrucciones del fabricante (consulte también la **aplicación ER100 del equipo Maxwell[®] RSC**).

El ensayo RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel contiene un **Internal Control DNA** que detecta la inhibición de la PCR, monitorea la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El **Internal Control DNA** puede usarse como control de inhibición de la PCR, o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el **Internal Control DNA** se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control DNA** se usa como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras **y** como control de inhibición de la PCR, se deben agregar 20 µl de **Internal Control DNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control DNA** debe añadirse siempre a la mezcla de búfer de lisado de muestras y **no** directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

9. Ejecución de la prueba

9.1 Preparación de la mezcla maestra

Calcule el número total de reacciones de PCR necesarias (reacciones de muestra y de control). En cada ensayo debe incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda calcular un 10 % de volumen adicional para compensar las imprecisiones en el pipeteo (consulte las tablas 3 y 4). Descongele, mezcle suavemente y centrifugue brevemente la [Reaction Mix], la [Taq-Polymerase], el [Positive Control], el [No Template Control] y el [Internal Control DNA] antes de utilizarlos. Conserve los reactivos correctamente en frío (2 °C a 8 °C) durante la etapa de trabajo.

Tabla 3: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de extracción y de inhibición de la PCR)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	[Reaction Mix]	19,3 µl	212,3 µl
2	[Taq-Polymerase]	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

Tabla 4: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de inhibición de la PCR únicamente)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
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
	Total	21.0 µl	231.0 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

9.2 Preparación de la mezcla de PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (tubo o placa).

Control negativo: Agregue 5 µl de **No Template Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo.

Muestra: Agregue 5 µl de eluato a la mezcla maestra prepipeteada.

Control positivo: Agregue 5 µl de **Positive Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control positivo.

Tape los tubos o la placa. Centrifúguelos y colóquelos en el equipo de PCR en tiempo real. La reacción de PCR debe iniciarse según la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 5, 6, 7, 8).

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil de ADN por PCR en tiempo real

Tabla 5: Perfil de PCR en tiempo real para los equipos LightCycler® y Rotor-Gene Q

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
PCR Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Tabla 6: Perfil de PCR en tiempo real para Mx3005P, ABI 7500 y CFX96™

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

9.3.2 Perfil universal por PCR en tiempo real

Nota: El perfil universal por PCR en tiempo real se debe usar en los ensayos de ADN solo cuando se combinan en una corrida los ensayos de ADN RIDA® GENE y ARN RIDA® GENE por PCR en tiempo real.

Tabla 7: Perfil universal por PCR en tiempo real en el equipo LightCycler®

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Tabla 8: Perfil universal por PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q y CFX96™

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 9: Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
Roche LightCycler® 480II	<i>M. hominis</i>	465/510	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	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	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	540/580	
	<i>U. urealyticum/parvum</i>	540/610	
	<i>M. genitalium</i>	610/670	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>M. hominis</i>	FAM	Compruebe que la opción de referencia sea «none» (ninguno).
	ICD	HEX	
	<i>U. urealyticum/parvum</i>	ROX	
	<i>M. genitalium</i>	Cy5	
ABI 7500	<i>M. hominis</i>	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna).
	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>	Verde	La ganancia debe configurarse en 5, según la configuración predeterminada.
	ICD	Amarillo	
	<i>U. urealyticum/parvum</i>	Naranja	
	<i>M. genitalium</i>	Rojo	

10. Control de calidad

El software del equipo de PCR en tiempo real usado analiza las muestras según las instrucciones del fabricante. Los controles positivo y negativo deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 10, figura 1) para que el ensayo se considere válido.

El **Positive Control** tiene una concentración de 10^3 copias/ μ l. En cada ensayo de PCR, se utiliza una cantidad total de 5×10^3 copias.

Tabla 10: Para que un ensayo sea válido, deben cumplirse las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado del ensayo	Ct del ICD	Ct de la diana
Control positivo	Positivo	ND * ¹	Consulte el certificado de garantía de calidad
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

*¹ No se requiere un valor de Ct del ICD para determinar que el control positivo es positivo.

Si el control positivo no es positivo en el intervalo de Ct especificado, pero el control negativo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si no se cumplen los criterios requeridos, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos usados
- Funcionalidad de los equipos utilizados
- Ejecución correcta de la prueba

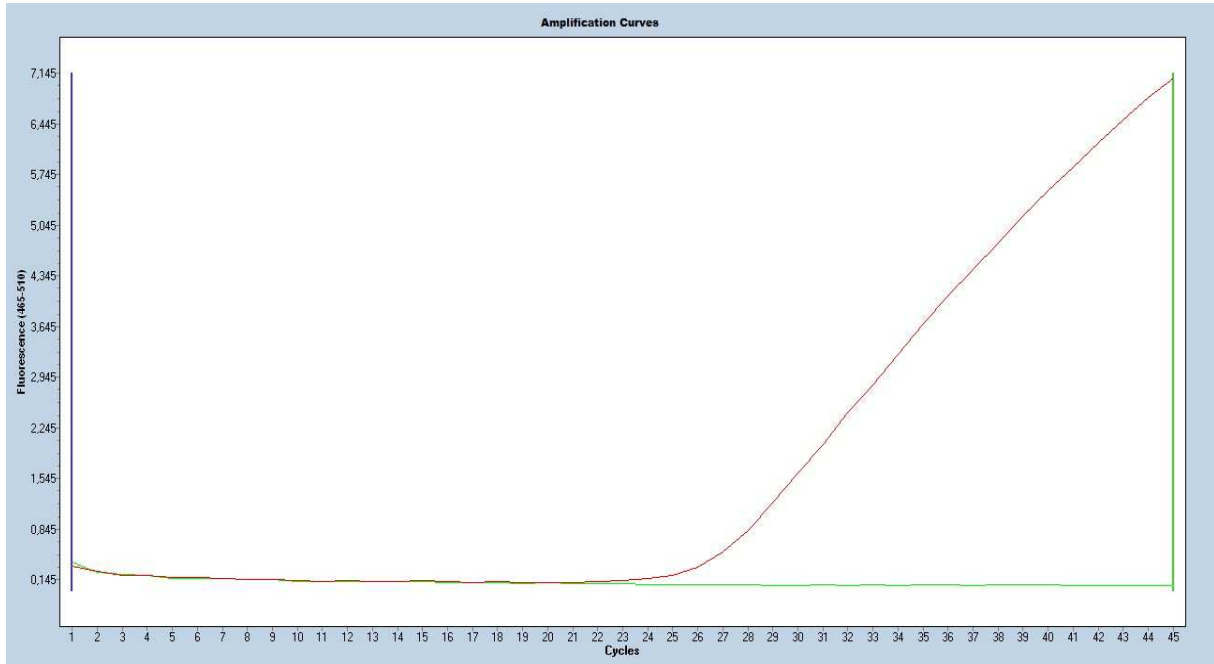


Figura 1: Procesamiento correcto del control positivo (rojo) y del control negativo (verde) (*Mycoplasma hominis*) en el LightCycler® 480II

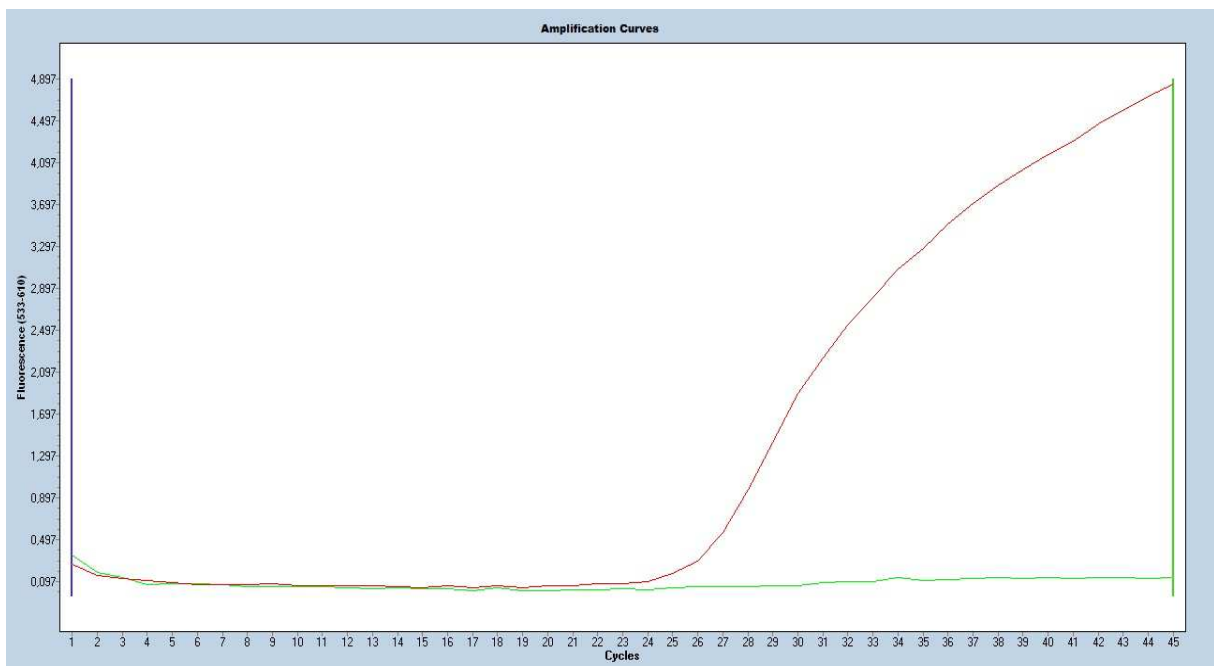


Figura 2: Procesamiento correcto del control positivo (rojo) y del control negativo (verde) (*Ureaplasma urealyticum/parvum*) en el LightCycler® 480II

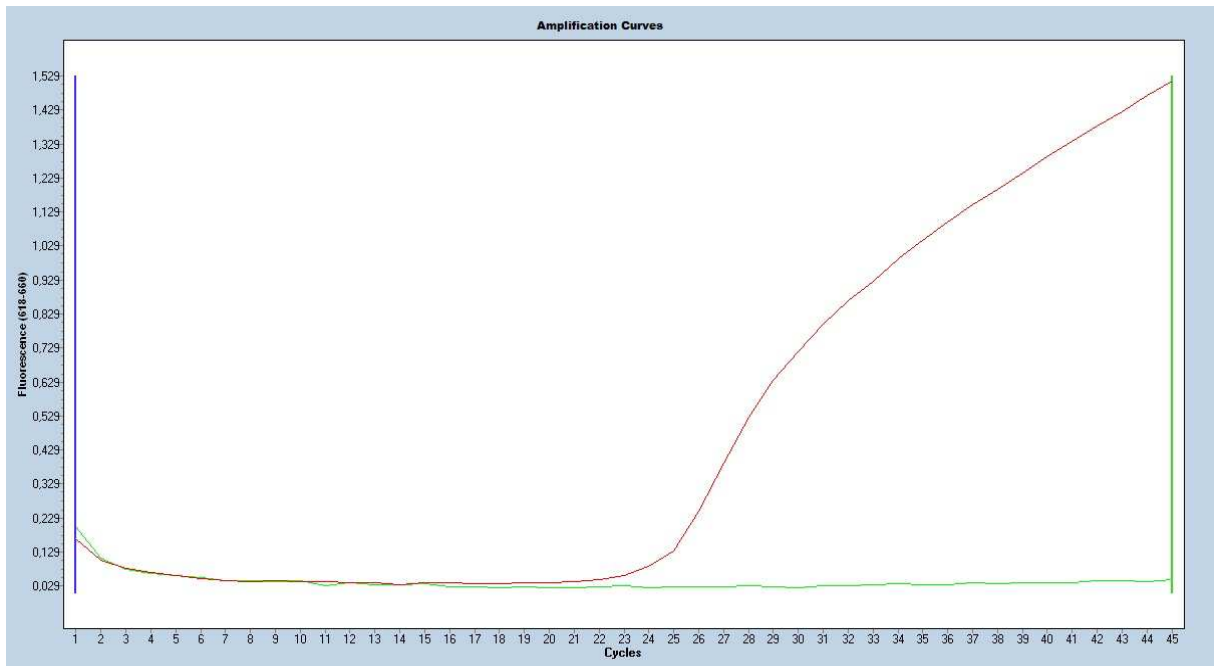


Figura 3: Procesamiento correcto del control positivo (rojo) y del control negativo (verde) (*Mycoplasma genitalium*) en el LightCycler® 480II

11. Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 11.

Tabla 11: Interpretación de las muestras

Genes diana			ICD	Resultado
<i>M. hominis</i>	<i>U. urealyticum/parvum</i>	<i>M. genitalium</i>		
positivo	negativo	negativo	positivo/negativo	<i>M. hominis</i> detectado
negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	<i>U. urealyticum/parvum</i> detectado
negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>M. genitalium</i> detectado
positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	<i>M. hominis</i> y <i>U. urealyticum/parvum</i> detectados
positivo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>M. hominis</i> y <i>M. genitalium</i> detectados
negativo	positivo	positivo	positivo/negativo	<i>U. urealyticum/parvum</i> y <i>M. genitalium</i> detectados
positivo	positivo	positivo	positivo/negativo	<i>M. hominis</i> , <i>U. urealyticum/parvum</i> y <i>M. genitalium</i> detectados
negativo	negativo	negativo	positivo	Genes diana no detectados
negativo	negativo	negativo	negativo	No válido

Se determina que una muestra es positiva si tanto el ADN de la muestra como el **Internal Control DNA** muestran una señal de amplificación en el sistema de detección.

También se considera positiva si hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero no del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La detección del control de amplificación interno no es necesaria debido a que las altas concentraciones del amplicón pueden hacer que la señal del **Internal Control DNA** sea débil o esté ausente.

La muestra se considera negativa si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero hay señal de amplificación del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR se puede excluir por la detección del ADN del **Internal Control DNA**.

La muestra no es válida si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra ni del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La muestra contiene un inhibidor de la PCR o se produjo un fallo en el procedimiento de extracción. Es

necesario diluir aún más la muestra extraída con agua para PCR (1:10) y amplificarla de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

12. Limitaciones del método

1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo está validado solo para frotis genitales y muestras de orina humanos.
3. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de la muestra, o una carga de patógenos en la muestra inferior a la sensibilidad analítica pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
4. La presencia de inhibidores de la PCR puede ocasionar resultados no válidos.
5. Las mutaciones o polimorfismos en las regiones de unión del cebador o la sonda pueden afectar a la detección de nuevas variantes, y producir un resultado negativo falso con el ensayo RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel.
6. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de la diana, por debajo del límite de detección (LD), pero los resultados podrían no ser reproducibles.
7. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. No obstante, un resultado positivo indica la presencia del gen diana (ARNr 16S, IGS).
8. En caso de que se utilicen hisopos genitales, la mucina puede mostrar un efecto de interferencia, incluso en pequeñas cantidades (validado en el canal de *U. urealyticum/parvum*).

13. Características de rendimiento

13.1 Sensibilidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE STI Mycoplasma Panel tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de ADN por reacción.

Las figuras 4, 5 y 6, a continuación, muestran una dilución seriada de *M. hominis*, *U. urealyticum/parvum* y *M. genitalium* ($10^5 - 10^1$ copias de ADN/ μ l en cada caso) en el LightCycler® 480II.

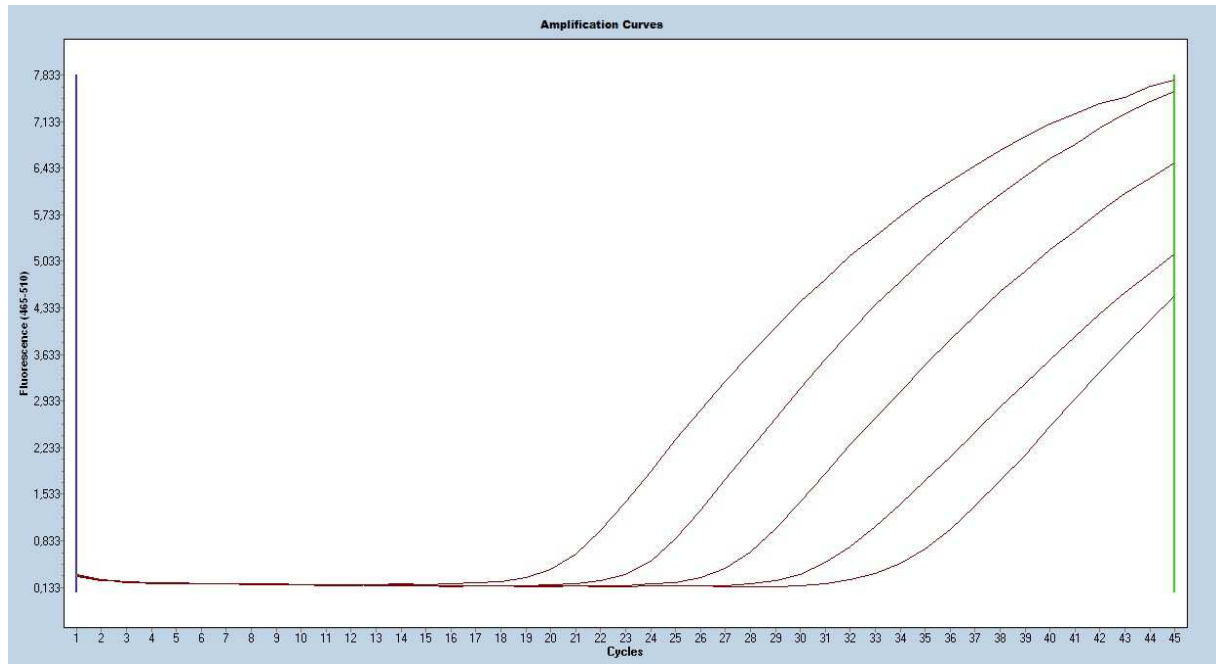


Figura 4: Dilución seriada de *Mycoplasma hominis* ($10^5 - 10^1$ copias de ADN/ μ l) en el LightCycler® 480II

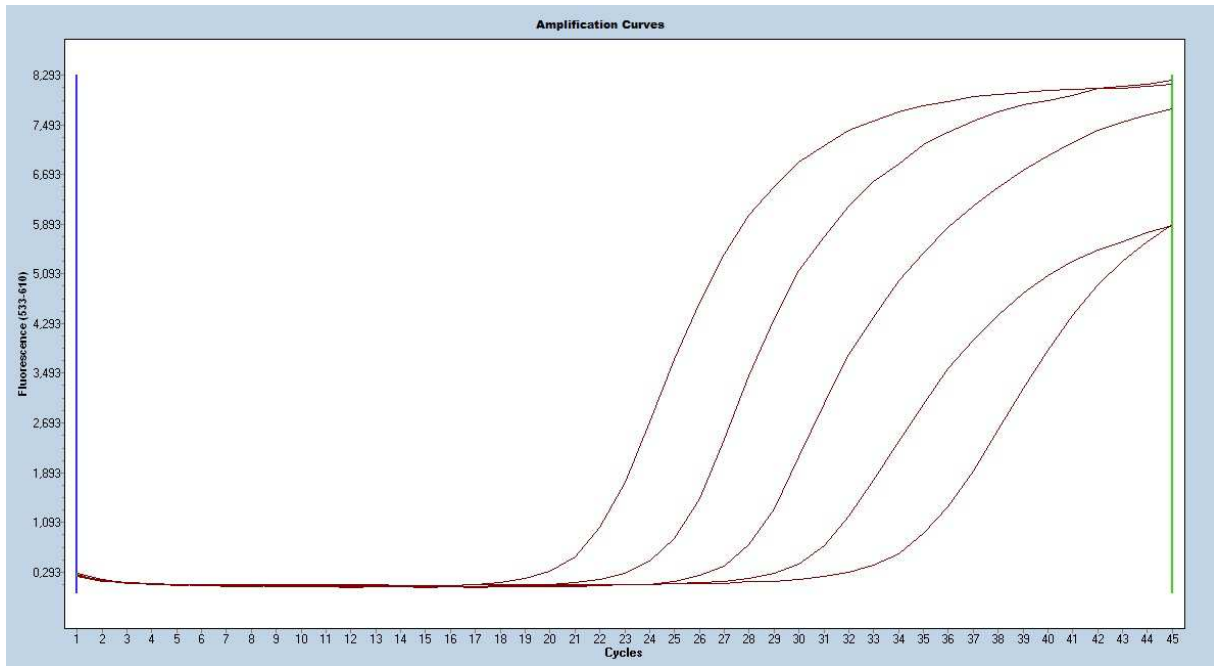


Figura 5: Dilución seriada de *Ureaplasma urealyticum/parvum* ($10^5 - 10^1$ copias de ADN/ μ l) en el LightCycler® 480II

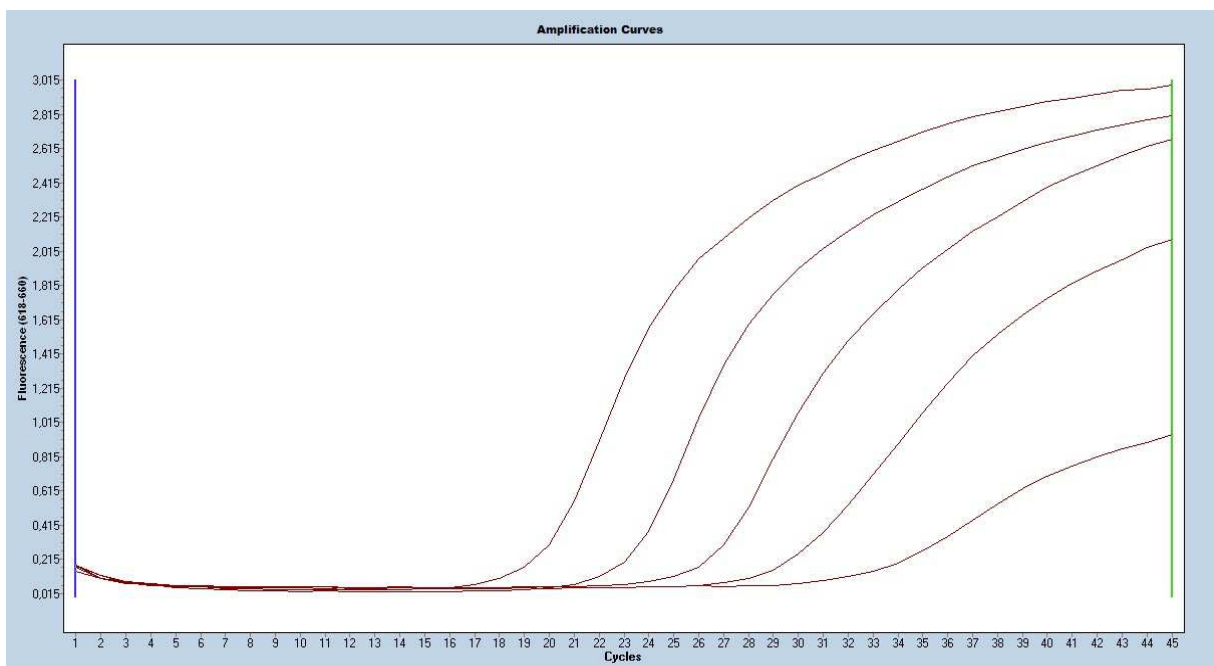


Figura 5: Dilución seriada de *Mycoplasma genitalium* ($10^5 - 10^1$ copias de ADN/ μ l) en el LightCycler® 480II

El límite de detección de todo el procedimiento depende de la matriz de la muestra, la extracción del ADN y la concentración del ADN.

13.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE STI Mycoplasma Panel es específica para *M. hominis*, *U. urealyticum/parvum* y *M. genitalium*. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 12):

Tabla 12: Ensayos de reactividad cruzada

<i>Candida albicans</i>	-	VHS 1	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	VHS 2	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	VPH 6b	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	VHP 16	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
<i>E. coli</i>	-	VHP 18	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Treponema pallidum	-
<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 Reactividad analítica

La reactividad del ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE STI Mycoplasma se evaluó en comparación con varios subtipos de *Mycoplasma* y *Ureaplasma* (consulte la tabla 13). Los subtipos indicados a continuación se detectaron con el ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE STI Mycoplasma Panel.

Tabla 13: Pruebas de reactividad analítica










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

14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2019-07-23	Revisión general 4. Reactivos suministrados 5. Instrucciones de almacenamiento 6. Reactivos necesarios no suministrados 7. Advertencias y precauciones para los usuarios 8. Recolección y almacenamiento 9. Ejecución de la prueba 10. Control de calidad 12. Limitaciones del método 13. Características de rendimiento 14. Historial de versiones 15. Explicación de los símbolos

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Obsérvese las instrucciones de uso
	Número de lote
	Utilizable hasta
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de pruebas
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

No aplicable

16. Bibliografía

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.

RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel

REF PG4945

1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. Le test RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe de *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* et *Ureaplasma urealyticum/parvum* dans l'urine et les frottis génitaux humains.

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel est destiné à faciliter le diagnostic des infections des voies urinaires ou de la région génitale provoquées par *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* et *Ureaplasma urealyticum/parvum*.

2. Résumé et explication du test

Les espèces de *Mycoplasma* peuvent persister dans la flore normale du système respiratoire ou de la région génitale de l'être humain¹. Parmi les espèces de mycoplasme présentes principalement dans la région génitale, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* et *Ureaplasma parvum* sont, parmi d'autres, décrites comme étant pathogènes^{1,2}.

Mycoplasma hominis (*M. hominis*) colonise essentiellement les voies génitales des hommes et femmes sexuellement actifs, mais la plupart des infections par *M. hominis* décrites ont été diagnostiquées chez des femmes². L'espèce *M. hominis* est associée à la maladie inflammatoire pelvienne (MIP) et peut provoquer des infections pendant ou après la grossesse, comme l'endométrite ou la pneumonie néonatale¹. Les symptômes courants des infections par *M. hominis* sont notamment une miction fréquente, un écoulement jaune ou la dysurie^{1,3}.

Au niveau mondial, la prévalence de *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*) va de 1 à 4 % chez les hommes et 1 à 6,4 % chez les femmes. Chez les hommes, *M. genitalium* peut provoquer une urétrite non spécifique et en est la deuxième cause la plus fréquente après *Chlamydia trachomatis*. Environ 30 % des urétrites persistantes sont liées à *M. genitalium*. Chez les femmes, les infections par *M. genitalium* peuvent provoquer une cervicite, une endométrite, une urétrite ou une maladie inflammatoire pelvienne (MIP)^{1,4}.

Ureaplasma urealyticum (*U. urealyticum*) et *Ureaplasma parvum* (*U. parvum*) sont des bactéries parasites à Gram négatif qui peuvent exister dans la flore urogénitale

des hommes et des femmes. En 2002, la nomenclature antérieure existante de 14 sérotypes d'*U. urealyticum* a été actualisée de telle manière que les sérotypes 1, 3, 6 et 14 regroupés sous le biovar Parvo (Biovar 1) constituent désormais une espèce différente (*U. parvum*). Les sérotypes 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 appartiennent au biovar T960 (Biovar 2) et ont donc été inscrits sous *U. urealyticum*⁵. Chez les femmes, *U. urealyticum* provoque essentiellement une maladie inflammatoire pelvienne (MIP) et *Ureaplasma* colonise la flore vaginale de jusqu'à 50 % des femmes enceintes. Pendant la grossesse, *Ureaplasma* peut être transmise à l'enfant, provoquant éventuellement des pneumonies ou des maladies du système nerveux central¹.

3. Principe du test

Le test RIDA[®]GENE STI Mycoplasma Panel est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe de *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum/parvum* dans l'urine et les frottis génitaux humains.

Après isolation de l'ADN survient l'amplification du fragment de gène (si présent) de *Mycoplasma hominis* (ARNr-16S), *Mycoplasma genitalium* (IGS) et *Ureaplasma urealyticum/parvum* (ARNr-16S). La cible amplifiée est détectée grâce à des sondes pour hydrolyse qui sont marquées à une extrémité par un extincteur et à l'autre extrémité par un colorant fluorescent indicateur (fluorophore). En présence d'une cible, les sondes s'hybrident aux amplicons. Pendant l'étape d'extension, la **Taq-Polymerase** rompt la proximité indicateur-extincteur. L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un instrument de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec le nombre d'amplicons formés. Le test RIDA[®]GENE STI Mycoplasma Panel contient un **Internal Control DNA** (ICD) en tant que contrôle interne de la procédure de préparation des échantillons et/ou pour déterminer une éventuelle inhibition de la PCR.

4. Contenu de la trousse

Tableau 1 : Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 100 déterminations)

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du couvercle
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	jaune
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rouge
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	blanc
P	Positive Control	1x	200 µl	bleu

5. Instructions de conservation des réactifs

- Protéger tous les réactifs de la lumière et les conserver à -20 °C. S'ils **ne sont pas ouverts**, tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Décongeler délicatement tous les réactifs avant de les utiliser (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 °C et 8 °C).
- Les réactifs peuvent supporter jusqu'à 20 cycles de congélation/décongélation sans que les performances du test ne soient affectées (par ex., après la première décongélation, séparer les réactifs en aliquotes et les congeler immédiatement).
- Pendant la préparation de la PCR, tous les réactifs doivent être conservés au frais de manière convenable (entre 2 °C et 8 °C).

6. Autres réactifs et matériel nécessaires

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA[®]GENE STI Mycoplasma Panel peut être utilisé avec les plateformes d'extraction et les instruments de PCR en temps réel suivants :

Tableau 2 : Matériel nécessaire

Plateformes d'extraction	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
Instruments de PCR en temps réel	
Roche	LightCycler [®] 480II, LightCycler [®] 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 [™]
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Remarque : utiliser uniquement des tubes de 0,1 ml sur le Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Si vous souhaitez utiliser d'autres plateformes d'extraction ou instruments de PCR en temps réel, contactez R-Biopharm à l'adresse mdx@r-biopharm.de.

- RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) pour une utilisation avec les appareils LightCycler[®] 480II et LightCycler[®] 480 z.
- Consommables de PCR en temps réel (plaques, tubes, feuilles)
- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons de réaction
- Agitateur-mélangeur vortex
- Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl)
- Pointes à filtre
- Gants jetables non poudrés
- Eau de PCR (sans nucléase)

7. Mesures de précaution

Pour le diagnostic *in vitro*.

Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Suivre le manuel d'instructions pour la réalisation du test. Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec une peau meurtrie ou les membranes muqueuses. Lors de la manipulation de réactifs ou d'échantillons, porter des vêtements de protection appropriés (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue de la réalisation du test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs sont utilisés.

- L'extraction, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR doivent être menées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée.
- Les échantillons doivent être traités comme du matériel potentiellement infectieux de même que tous les réactifs et le matériel exposés aux échantillons. Ils doivent être manipulés conformément aux règlements nationaux en matière de sécurité.
- Ne pas utiliser le kit après sa date de péremption.

Après utilisation, tous les réactifs et matériaux utilisés doivent être éliminés de façon appropriée. Veuillez vous conformer aux règlements nationaux applicables concernant la mise au rebut.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur www.r-biopharm.com.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

8.1 Préparation de l'ADN à partir de frottis génitaux secs

Pour isoler l'ADN des frottis génitaux secs, utiliser un kit d'isolation d'ADN (par ex., RIDA[®] Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'ADN (par ex., Maxwell[®] RSC [Promega]) disponible dans le commerce. Extraire l'ADN conformément aux instructions du fabricant.

Pour isoler l'ADN des écouvillons secs, il est recommandé de suivre la procédure suivante : Ajouter 400 µl d'eau de PCR dans un tube de préparation. Insérer l'écouvillon dans l'eau, le presser et couper ou casser la tige de l'écouvillon. Fermer hermétiquement le tube de préparation et continuer conformément aux instructions du fabricant du kit ou du système d'extraction de l'ADN (voir aussi **Maxwell[®] RSC Application ER101**).

Le test RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel inclut un **Internal Control DNA** qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante. L'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** peut être utilisé comme contrôle de l'inhibition de la PCR ou comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et en tant que contrôle de l'inhibition de la PCR.

Si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître (voir tableau 4).

Si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 20 µl pendant la procédure d'extraction. L'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est aussi recommandé d'ajouter 1 µl d'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** au mélange de contrôle négatif et de contrôle positif de la PCR.

8.2 Préparation de l'ADN à partir de l'urine

Pour isoler l'ADN de l'urine, utiliser un kit d'isolation d'ADN (par ex., RIDA[®] Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'ADN (par ex., Maxwell[®] RSC [Promega]) disponible dans le commerce. Extraire l'ADN conformément aux instructions du fabricant (voir aussi **Maxwell[®] RSC Application ER100**).

Le test RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel inclut un **Internal Control DNA** qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante. L'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** peut être utilisé comme contrôle de l'inhibition de la PCR ou comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et en tant que contrôle de l'inhibition de la PCR.

Si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître (voir tableau 4).

Si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 20 µl pendant la procédure d'extraction. L'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est aussi recommandé d'ajouter 1 µl d'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** au mélange de contrôle négatif et de contrôle positif de la PCR.

9. Réalisation du test

9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions de PCR (réactions de l'échantillon et réactions de contrôle) nécessaires. Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus à chaque exécution du test.

Nous recommandons de calculer un volume supplémentaire de 10 % pour compenser l'imprécision du pipetage (voir tableaux 3, 4). Décongeler, mélanger délicatement et centrifuger brièvement le mélange réactif [Reaction Mix], la [Taq-Polymerase], le contrôle positif [Positive Control], le contrôle sans matrice [No Template Control] et l'ADN de contrôle interne [Internal Control DNA] avant utilisation. Conserver les réactifs à une température assez basse durant l'étape de travail (entre 2 °C et 8 °C).

Tableau 3 : Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICD comme contrôle de l'extraction et de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
1	[Reaction Mix]	19,3 µl	212,3 µl
2	[Taq-Polymerase]	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

Tableau 4 : Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICD uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
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
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µl du mélange maître dans chaque flacon de réaction (tube ou plaque).

Contrôle négatif : Ajouter 5 µl de contrôle sans matrice **No Template Control** au mélange maître pré-pipeté.

Remarque : si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle négatif pour la PCR.

Échantillon : Ajouter 5 µl d'éluat au mélange maître pré-pipeté.

Contrôle positif : Ajouter 5 µl de contrôle positif **Positive Control** au mélange maître pré-pipeté.

Remarque : si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle positif pour la PCR.

Recouvrir les tubes ou la plaque. Les centrifuger et les placer dans l'instrument de PCR en temps réel. La réaction de PCR devrait commencer conformément à la configuration de l'instrument de PCR (voir tableaux 5, 6, 7, 8).

9.3 Configuration de l'instrument de PCR

9.3.1 Profil de PCR en temps réel de l'ADN

Tableau 5 : Profil de PCR en temps réel pour la série LightCycler® et Rotor-Gene Q

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température/	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Tableau 6 : Profil de PCR en temps réel pour Mx3005P, ABI 7500 et CFX96™

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température/	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

9.3.2 Profil universel de PCR en temps réel

Remarque : le profil universel de PCR en temps réel doit seulement être utilisé pour les tests d'ADN si les tests PCR en temps réel ADN RIDA® GENE et ARN RIDA® GENE sont effectués lors d'une même exécution.

Tableau 7 : Profil universel de PCR en temps réel pour la série LightCycler®

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température/	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Tableau 8 : Profil universel de PCR en temps réel pour Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q et CFX96™

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température/	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

9.4 Configuration du canal de détection

Tableau 9 : Sélection des canaux de détection adéquats

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Remarque
Roche LightCycler® 480II	<i>M. hominis</i>	465/510	Le RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	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	Le RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	540/580	
	<i>U. urealyticum/parvum</i>	540/610	
	<i>M. genitalium</i>	610/670	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>M. hominis</i>	FAM	Vérifier que l'option de référence n'est pas précisée
	ICD	HEX	
	<i>U. urealyticum/parvum</i>	ROX	
	<i>M. genitalium</i>	Cy5	
ABI 7500	<i>M. hominis</i>	FAM	Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée
	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>	Vert	Les paramètres de gain doivent être réglés sur 5, conformément aux paramètres par défaut
	ICD	Jaune	
	<i>U. urealyticum/parvum</i>	Orange	
	<i>M. genitalium</i>	Rouge	

10. Contrôle qualité

L'analyse des échantillons est effectuée par le logiciel de l'instrument de PCR en temps réel utilisé conformément aux instructions du fabricant. Le contrôle négatif et le contrôle positif doivent obtenir des résultats corrects (voir tableau 10, figure 1) pour que l'exécution soit déclarée valide.

Le contrôle positif **Positive Control** a une concentration de 10^3 copies/ μ l. Chaque série de PCR utilise au total 5×10^3 copies de contrôle positif.

Tableau 10 : Pour que l'exécution soit valide, les conditions suivantes doivent être satisfaites :

Échantillon	Résultat du test	Ct ICD	Ct cible
Contrôle positif	Positif	S/O *1	Voir Certificat d'assurance qualité
Contrôle négatif	Négative	Ct > 20	0

*1 *Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICD soit positif pour le contrôle positif.*

Si le contrôle positif n'est pas positif dans la plage de Ct spécifiée, mais que le contrôle négatif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais le contrôle positif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si les critères requis ne sont pas satisfaits, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnement de l'instrumentation utilisée
- Exécution correcte de la procédure de test

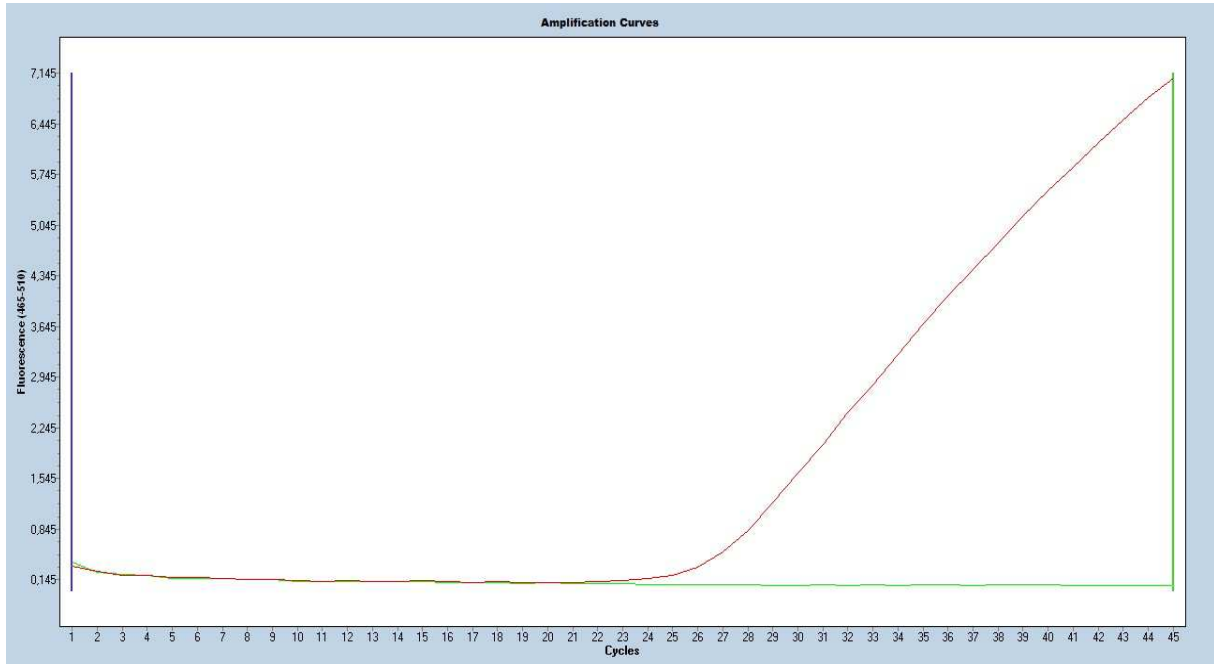


Fig. 1 : Exécution correcte des contrôles positif (rouge) et négatif (vert) (*Mycoplasma hominis*) sur le LightCycler® 480II

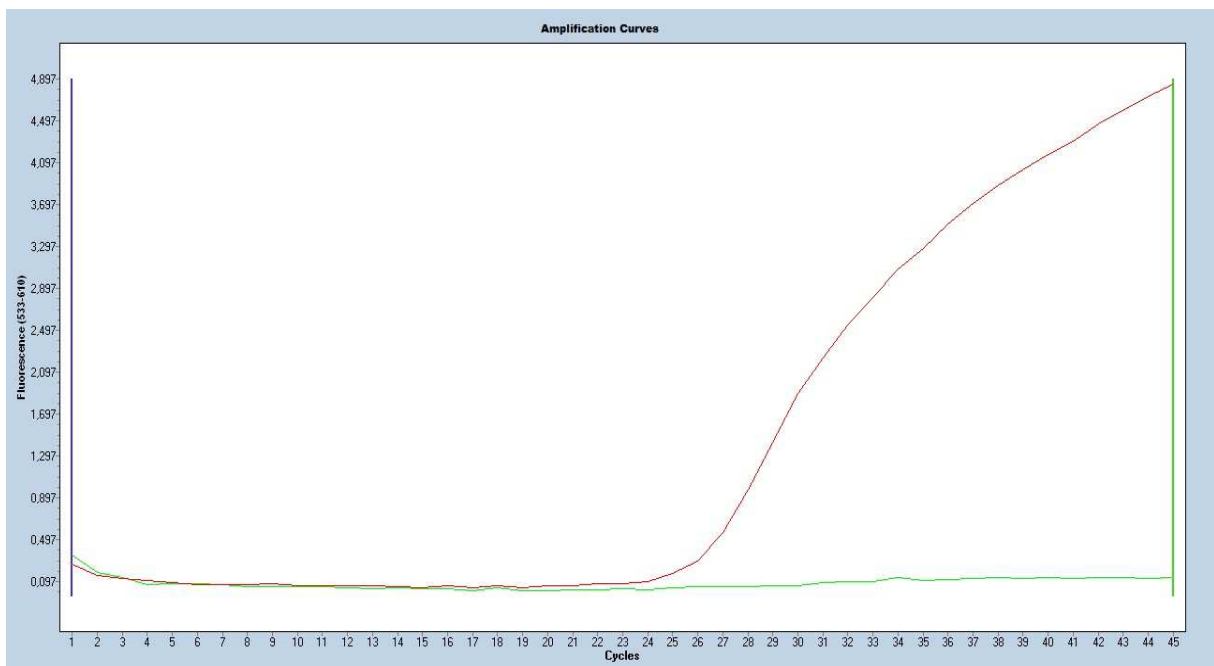


Figure 2 : Exécution correcte des contrôles positif (rouge) et négatif (vert) (*Ureaplasma urealyticum/parvum*) sur le LightCycler® 480II

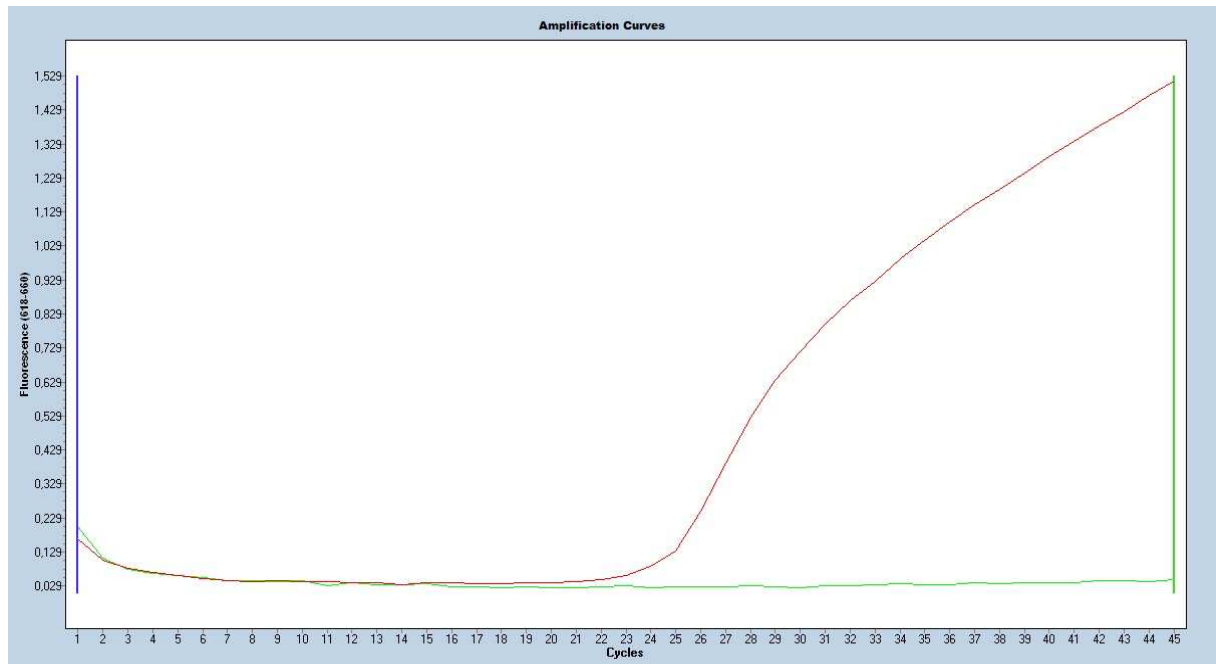


Figure 3 : Exécution correcte des contrôles positif (rouge) et négatif (vert) (*Mycoplasma genitalium*) sur le LightCycler® 480II

11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 11.

Tableau 11 : Interprétation des échantillons

Gènes cibles			ICD	Résultat
<i>M. hominis</i>	<i>U. urealyticum/parvum</i>	<i>M. genitalium</i>		
positif	négatif	négatif	positif/négatif	<i>M. hominis</i> détecté
négatif	positif	négatif	positif/négatif	<i>U. urealyticum/parvum</i> détecté
négatif	négatif	positif	positif/négatif	<i>M. genitalium</i> détecté
positif	positif	négatif	positif/négatif	<i>M. hominis</i> et <i>U. urealyticum/parvum</i> détectés
positif	négatif	positif	positif/négatif	<i>M. hominis</i> et <i>M. genitalium</i> détectés
négatif	positif	positif	positif/négatif	<i>U. urealyticum/parvum</i> et <i>M. genitalium</i> détectés
positif	positif	positif	positif/négatif	<i>M. hominis</i> , <i>U. urealyticum/parvum</i> et <i>M. genitalium</i> détectés
négatif	négatif	négatif	positif	Gènes cibles non détectés
négatif	négatif	négatif	négatif	Non valide

Un échantillon est estimé positif si l'ADN de l'échantillon et l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

Un échantillon est également estimé positif si l'ADN de l'échantillon présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais aucun pour l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA**. La détection du contrôle d'amplification interne n'est pas nécessaire, car les concentrations élevées de l'amplicon peuvent générer un signal faible ou absent de l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA**.

Un échantillon est estimé négatif si l'ADN de l'échantillon ne présente aucun signal d'amplification dans le système de détection, mais en présente un pour l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA**. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection de l'ADN du contrôle interne **Internal Control DNA**.

Un échantillon est non valide si l'ADN de l'échantillon et l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. L'échantillon contient un inhibiteur de la PCR ou la procédure d'extraction est défectueuse. L'échantillon extrait doit être encore dilué avec de l'eau

de PCR (1/10) et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

12. Limites de la méthode

1. Le résultat de l'analyse moléculaire ne doit pas mener au diagnostic, mais toujours être examiné dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est seulement validé pour les frottis génitaux et les échantillons d'urine humains.
3. Les prélèvement, transport, stockage et traitement incorrects de l'échantillon ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
4. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats non valides.
5. Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison à l'amorce ou à la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants et donner lieu à un résultat faux négatif avec le test RIDA® GENE Mycoplasma Panel.
6. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* de type PCR, des niveaux de la cible extrêmement bas sous la limite de détection (LDD) peuvent être détectés, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
7. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Cependant, un résultat positif indique la présence des gènes cibles (ARNr-16S, IGS).
8. Lorsque des frottis génitaux sont utilisés, la mucine peut interférer, même en petites quantités (validé dans le canal *U. urealyticum/parvum*).

13. Performances

13.1 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE STI Mycoplasma Panel est ≥ 10 copies d'ADN par réaction.

Les figures 4, 5 et 6 suivantes montrent les séries de dilution de *M. hominis*, *U. urealyticum/parvum* et *M. genitalium* ($10^5 - 10^1$ copies d'ADN par μl chacune) avec le LightCycler® 480II.

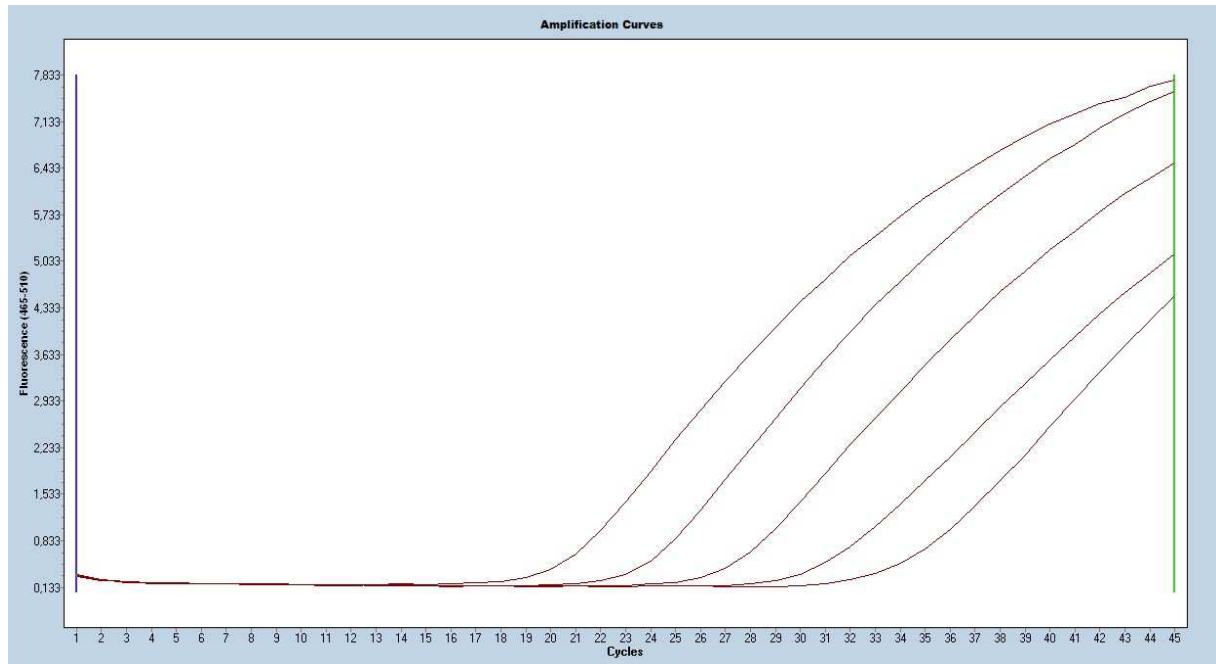


Figure 4 : Série de dilutions pour *Mycoplasma hominis* ($10^5 - 10^1$ copies d'ADN par μl) avec le LightCycler® 480II

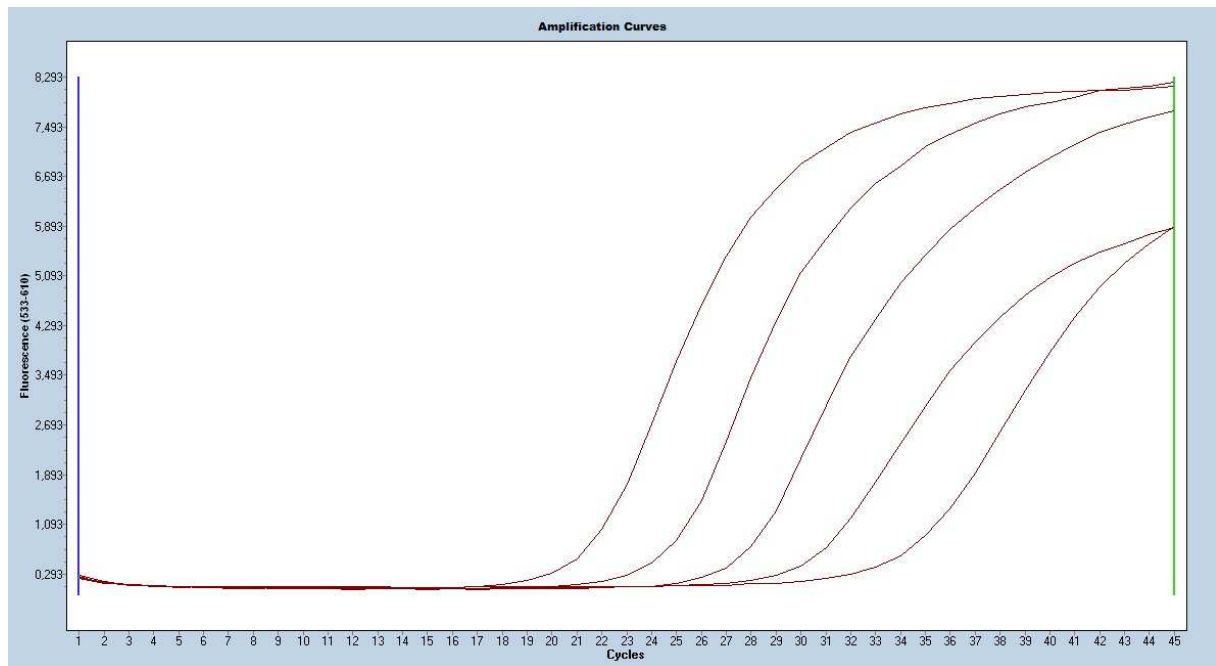


Fig. 5 : Série de dilutions pour *Ureaplasma urealyticum/parvum* ($10^5 - 10^1$ copies d'ADN par μl) avec le LightCycler[®] 480II

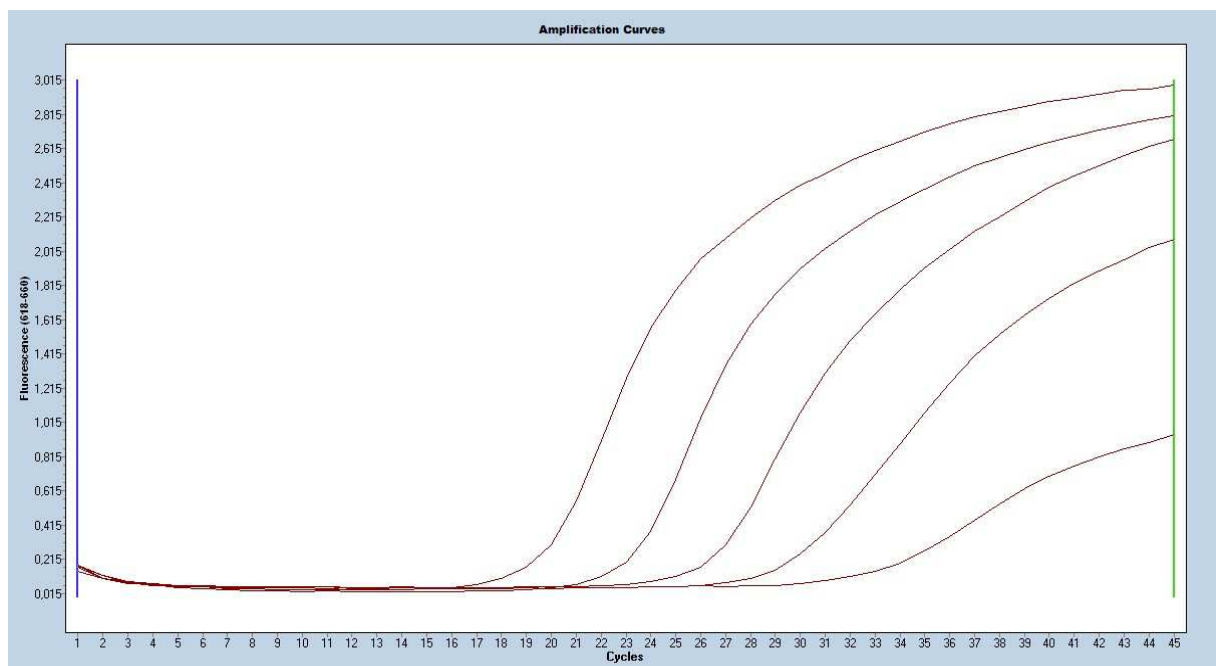


Fig. 5 : Série de dilutions pour *Mycoplasma genitalium* ($10^5 - 10^1$ copies d'ADN par μl) avec le LightCycler[®] 480II

La limite de détection de l'ensemble de la procédure dépend de la matrice de l'échantillon, de l'extraction de l'ADN et de la concentration de l'ADN.

13.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE STI Mycoplasma Panel est spécifique pour *M. hominis*, *U. urealyticum/parvum* et *M. genitalium*. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 12) :

Tableau 12 : Test de la réactivité croisée

<i>Candida albicans</i>	-	VHS 1	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	VHS 2	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	VPH 6b	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	VPH 16	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
<i>E. coli</i>	-	VPH 18	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Treponema pallidum	-
<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 Réactivité analytique

La réactivité du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE STI Mycoplasma Panel a été évaluée par rapport à plusieurs sous-types de *Mycoplasma* et *Ureaplasma* (voir tableau 13). Les sous-types indiqués ci-dessous ont été détectés par le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE STI Mycoplasma Panel.

Tableau 13 : Test de la réactivité analytique










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

14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2019-07-23	Révision générale 4. Contenu de la trousse 5. Instructions de conservation des réactifs 6. Autres réactifs et matériel nécessaires 7. Mesures de précaution 8. Prélèvement et conservation 9. Réalisation du test 10. Contrôle qualité 12. Limites de la méthode 13. Performances 14. Historique des versions 15. Signification des symboles

15. Signification des symboles

Symboles généraux

	Diagnostic <i>in vitro</i> .
	Respecter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Utiliser avant le
	Température de stockage
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques au test

Sans objet

16. Bibliographie

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.

RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel

REF PG4945

1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel è un test di PCR real time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta di *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* e *Ureaplasma urealyticum/parvum* da tamponi genitali e da urina umani.

Il test di PCR real time multiplex RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel è adatto come ausilio nella diagnosi delle infezioni del tratto urinario o dell'area genitale causate da *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* e *Ureaplasma urealyticum/parvum*.

2. Sintesi e spiegazione del test

Le specie di *Mycoplasma* possono persistere come parte della normale flora batterica umana del sistema respiratorio o della zona genitale.¹ Tra le specie di micoplasma presenti principalmente nella zona genitale, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* sono descritti, insieme ad altri, come patogeni.^{1,2}

Mycoplasma hominis (*M. hominis*) colonizza principalmente il tratto genitale di uomini e donne sessualmente attivi, tuttavia la maggior parte delle infezioni da *M. hominis* descritte è stata diagnosticata nella donna.² *M. hominis* è associato a malattia infiammatoria pelvica (PID) e può causare infezioni durante o dopo la gravidanza, come l'endometrite o la polmonite neonatale.¹ I sintomi comuni delle infezioni da *M. hominis* includono, ad esempio, minzione frequente, scolo giallastro o disuria.^{1,3}

A livello globale, la prevalenza di *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*) è di 1-4% per gli uomini e 1-6,4% per le donne. Negli uomini, *M. genitalium* può provocare uretrite aspecifica ed è la seconda causa più comune dopo *Chlamydia trachomatis*. Circa il 30% delle uretriti persistenti sono legate a *M. genitalium*. Nelle donne, le infezioni da *M. genitalium* possono causare cervicite, endometrite, uretrite o malattia infiammatoria pelvica (PID)^{1,4}.

Ureaplasma urealyticum (*U. urealyticum*) e *Ureaplasma parvum* (*U. parvum*) sono batteri parassiti Gram-negativi che possono far parte della flora urogenitale di uomini e donne. Nel 2002 la precedente nomenclatura di 14 sierotipi di *U. urealyticum* è stata aggiornata, così che oggi i sierotipi 1, 3, 6 e 14, che sono raggruppati con la biovar Parvo (Biovar 1), sono elencati come specie separate (*U. parvum*). I sierotipi 2,

4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 appartengono alla biovar T960 (Biovar 2) e quindi sono elencati come *U. urealyticum*.⁵ Nelle donne, *U. urealyticum* causa prevalentemente malattia infiammatoria pelvica (PID), mentre *Ureaplasma* colonizza la flora vaginale fino al 50% delle donne in gravidanza. Durante la gravidanza, *Ureaplasma* può essere trasmesso al feto e causare polmonite o malattie del sistema nervoso centrale¹.

3. Principio del test

RIDA[®]GENE STI Mycoplasma Panel è un test di PCR real time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta di *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* e *Ureaplasma urealyticum/parvum* da tamponi genitali e da urina umani.

Dopo l'isolamento del DNA, viene eseguita l'amplificazione dei frammenti genetici (se presenti) specifici per *Mycoplasma hominis* (16S-rRNA), *Mycoplasma genitalium* (IGS) e *Ureaplasma urealyticum/parvum* (16S-rRNA). Il target amplificato viene rivelato con sonde a idrolisi marcate su un'estremità con un quencher e sull'altra con un colorante fluorescente (fluoroforo). In presenza di un target, le sonde ibridano con gli ampliconi. Durante la fase di estensione, la **Taq-Polymerase** rompe la prossimità fra rivelatore (reporter) e attenuatore (quencher). Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA[®]GENE STI Mycoplasma contiene un **Internal Control DNA** (ICD) quale controllo interno della procedura di preparazione del campione e/o per la determinazione della possibile inibizione della PCR.

4. Contenuto della confezione

Tabella 1: Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni)

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	giallo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rosso
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	arancione
N	No Template Control	1x	450 µl	bianco
P	Positive Control	1x	200 µl	blu

5. Istruzioni di conservazione

- Proteggere tutti i reagenti dalla luce e conservarli a una temperatura di -20 °C. **Se non aperti**, tutti i reagenti possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Dopo la scadenza, la garanzia di qualità non è più valida.
- Scongelare i reagenti con cura e completamente prima dell'uso (ad esempio in frigorifero a 2 - 8 °C).
- I reagenti possono sopportare fino a 20 cicli di congelamento/scongelamento senza compromettere i test (ad esempio, dopo il primo scongelamento separare il reagente in aliquote e ricongelare immediatamente).
- Durante la preparazione della PCR tutti i reagenti devono essere conservati al freddo in modo appropriato (2 - 8 °C).

6. Reagenti e dispositivi aggiuntivi necessari

Il test di PCR real time multiplex RIDA[®]GENE STI Mycoplasma Panel è adatto per l'uso con le seguenti piattaforme di estrazione e strumenti per la PCR real time:

Tabella 2: Attrezzatura necessaria

Piattaforme di estrazione	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
Strumenti per la PCR real-time	
Roche	LightCycler [®] 480II, LightCycler[®] 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 [™]
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Avvertenze: sullo strumento Rotor-Gene Q (QIAGEN) utilizzare solo provette da 0,1 ml.

Se per la PCR real-time si preferisce utilizzare altre piattaforme di estrazione o strumenti, contattare R-Biopharm all'indirizzo mdx@r-biopharm.de.

- RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per l'uso con LightCycler[®] 480II e **LightCycler[®] 480 z**.
- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, provette, fogli)
- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione
- Agitatore a vortice
- Pipette (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Puntali con filtro
- Guanti monouso senza talco
- **Acqua per PCR (priva di nucleasi)**

7. Precauzioni per gli utilizzatori

Per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi al manuale di istruzioni per l'esecuzione del test. Non pipettare campioni o reagenti con la bocca. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose. Quando si maneggiano reagenti o campioni, indossare abbigliamento di sicurezza adeguato (guanti, camice, occhiali di sicurezza idonei) e lavarsi le mani dopo l'esecuzione del test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si manipolano i campioni o i reagenti.

- L'estrazione, la preparazione della PCR e l'esecuzione della PCR devono avvenire in locali separati per evitare contaminazione crociata.

- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi, così come tutti i reagenti e i materiali esposti ai campioni, e devono essere maneggiati nel rispetto delle disposizioni di sicurezza nazionali.

- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.

Tutti i reagenti e i materiali utilizzati devono essere smaltiti correttamente dopo l'uso. Attenersi alle disposizioni nazionali in vigore in materia di smaltimento.

Per maggiori informazioni consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo www.r-biopharm.com.

8. Raccolta e conservazione di campioni

8.1 Preparazione del DNA da tamponi genitali asciutti

Per l'isolamento del DNA da tamponi genitali asciutti utilizzare un kit (ad es. RIDA[®] Xtract (R. Biopharm)) o un sistema di estrazione disponibile in commercio (ad es. Maxwell[®] RSC (Promega)). Estrarre il DNA in base alle istruzioni del produttore. Per l'isolamento del DNA dai tamponi asciutti si raccomanda la seguente procedura: Dispensare 400 µl di acqua per PCR in una provetta di preparazione. Inserire il tampone nell'acqua, strizzarlo e tagliare o spezzare il fusto. Chiudere bene la provetta di preparazione, vorticare brevemente e seguire le istruzioni del produttore del kit di estrazione del DNA o del sistema di estrazione del DNA (vedere anche Maxwell[®] RSC Applicazione ER101).

Il test RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel contiene un **Internal Control DNA** che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente. L'**Internal Control DNA** può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR.

Se l'**Internal Control DNA** viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla Master Mix (vedere Tabella 4).

Se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere

20 µl di **Internal Control DNA** durante la procedura di estrazione.

L'**Internal Control DNA** deve sempre essere aggiunto alla miscela tampone di lisi del campione e **non** direttamente ai campioni. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

8.2 Preparazione del DNA da campioni di urina

Per l'isolamento del DNA da campioni di urina utilizzare un kit (ad es. RIDA[®] Xtract (R. Biopharm)) o un sistema di estrazione disponibile in commercio (ad es. Maxwell[®] RSC (Promega)). Estrarre il DNA in base alle istruzioni del produttore (vedere anche **Maxwell[®] RSC Applicazione ER100**).

Il test RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel contiene un **Internal Control DNA** che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente. L'**Internal Control DNA** può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR.

Se l'**Internal Control DNA** viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla Master Mix (vedere Tabella 4).

Se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 20 µl di **Internal Control DNA** durante la procedura di estrazione.

L'**Internal Control DNA** deve sempre essere aggiunto alla miscela tampone di lisi del campione e **non** direttamente ai campioni. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

9. Esecuzione del test

9.1 Preparazione della Master Mix

Calcolare il numero totale di reazioni di PCR (reazioni campione e di controllo) necessarie. Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

Si raccomanda di calcolare un volume aggiuntivo del 10 % a compensazione di un pipettaggio non preciso (vedere Tabella 3, Tabella 4). Prima dell'uso scongelare, miscelare delicatamente e centrifugare brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, il **Positive Control**, il **No Template Control** e l'**Internal Control DNA**. Durante la fase di lavorazione tenere i reagenti adeguatamente refrigerati (2-8 °C).

Tabella 3: Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICD come controllo di estrazione e inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Totale	20 µl	220 µl

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

Tabella 4: Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICD solo come controllo di inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10% extra)
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
	Totale	21,0 µl	231,0 µl

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

9.2 Preparazione della PCR Mix

Pipettare 20 µl della Master Mix in ogni cuvetta di reazione (provetta o piastra).

Controllo negativo: dispensare 5 µl di **No Template Control** nella Master Mix pre-pipettata.

Avvertenze: se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix del controllo negativo.

Campione: dispensare 5 µl di eluato nella Master Mix pre-pipettata.

Controllo positivo: dispensare 5 µl di **Positive Control** nella Master Mix pre-pipettata.

Avvertenze: se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix del controllo positivo.

Coprire le provette o la piastra. Eseguire lo spin down e collocarle nello strumento per PCR real-time. La reazione di PCR deve essere avviata in base all'impostazione dello strumento per PCR (vedere Tabella 5, Tabella 6, Tabella 7, Tabella 8).

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo PCR real-time per DNA

Tabella 5: Profilo della PCR real-time per la serie LightCycler® e Rotor-Gene Q

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tabella 6: Profilo PCR real-time per Mx3005P, ABI 7500 e CFX96™

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

9.3.2 Profilo PCR real-time universale

Avvertenze: Il profilo della PCR real-time universale deve essere utilizzato per i test del DNA solo quando i test di PCR real-time RIDA[®] GENE DNA e RIDA[®] GENE RNA vengono effettuati in un unico ciclo.

Tabella 7: Profilo PCR real-time universale per la serie LightCycler[®]

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura/velocità di rampa	Massima

Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tabella 8: Profilo PCR real-time universale per Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q e CFX96[™]

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura/velocità di rampa	Massima

Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

9.4 Impostazione del canale di rivelazione

Tabella 9: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Avvertenze
Roche LightCycler® 480II	<i>M. hominis</i>	465/510	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	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	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	540/580	
	<i>U. urealyticum/parvum</i>	540/610	
	<i>M. genitalium</i>	610/670	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>M. hominis</i>	FAM	Controllare che non vi sia opzione di riferimento
	ICD	HEX	
	<i>U. urealyticum/parvum</i>	ROX	
	<i>M. genitalium</i>	Cy5	
ABI 7500	<i>M. hominis</i>	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno
	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>	Verde	Le impostazioni di amplificazione devono essere regolate su 5, in base alle impostazioni predefinite
	ICD	Giallo	
	<i>U. urealyticum/parvum</i>	Arancione	
	<i>M. genitalium</i>	Rosso	

10. Controllo qualità

L'analisi dei campioni viene eseguita dal software dello strumento per PCR real-time utilizzato, in base alle istruzioni del produttore. Perché l'esecuzione sia valida, il controllo negativo e il controllo positivo devono mostrare i risultati corretti (vedere Tabella 10, Figura 1).

Il **Positive Control** ha una concentrazione di 10^3 copie/ μ l. In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di 5×10^3 copie.

Tabella 10: Perché l'esecuzione sia valida occorre che siano soddisfatte le seguenti condizioni:

Campione	Risultato del test	Ct ICD	Ct Target
Controllo positivo	Positivo	NA * ¹	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	0

*¹ Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICD.

Se il controllo positivo non è positivo nel range Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se i criteri richiesti non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test

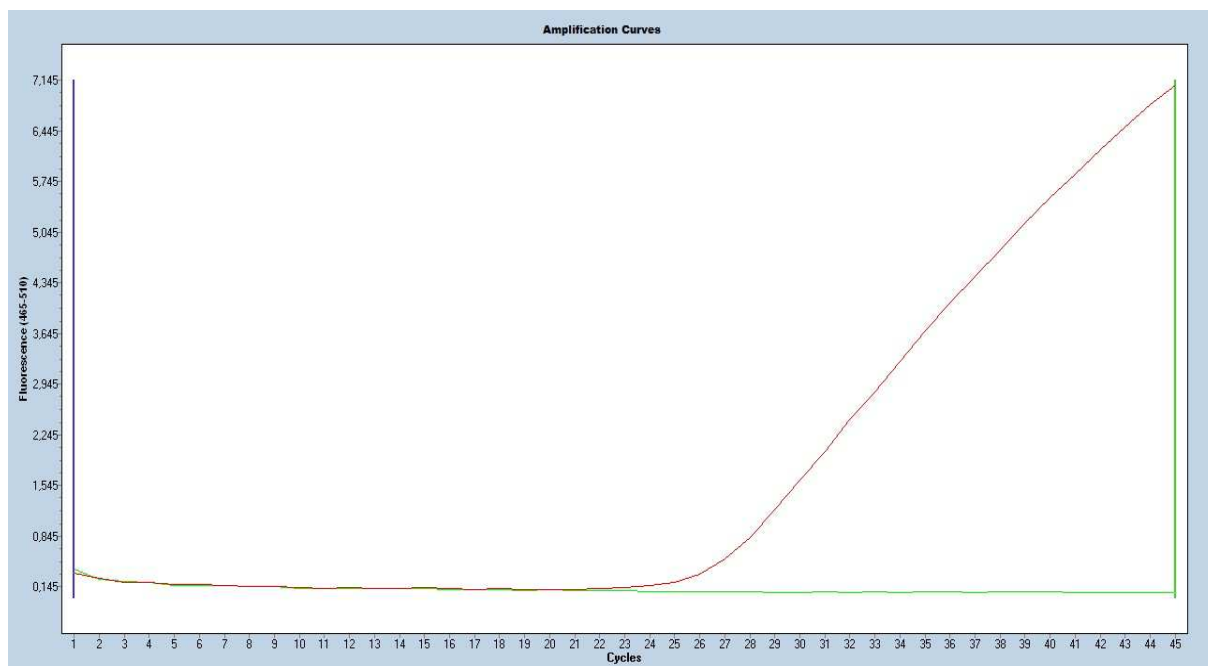


Figura 1: Esecuzione corretta del controllo positivo (rosso) e del controllo negativo (verde) (*Mycoplasma hominis*) sul LightCycler® 480II

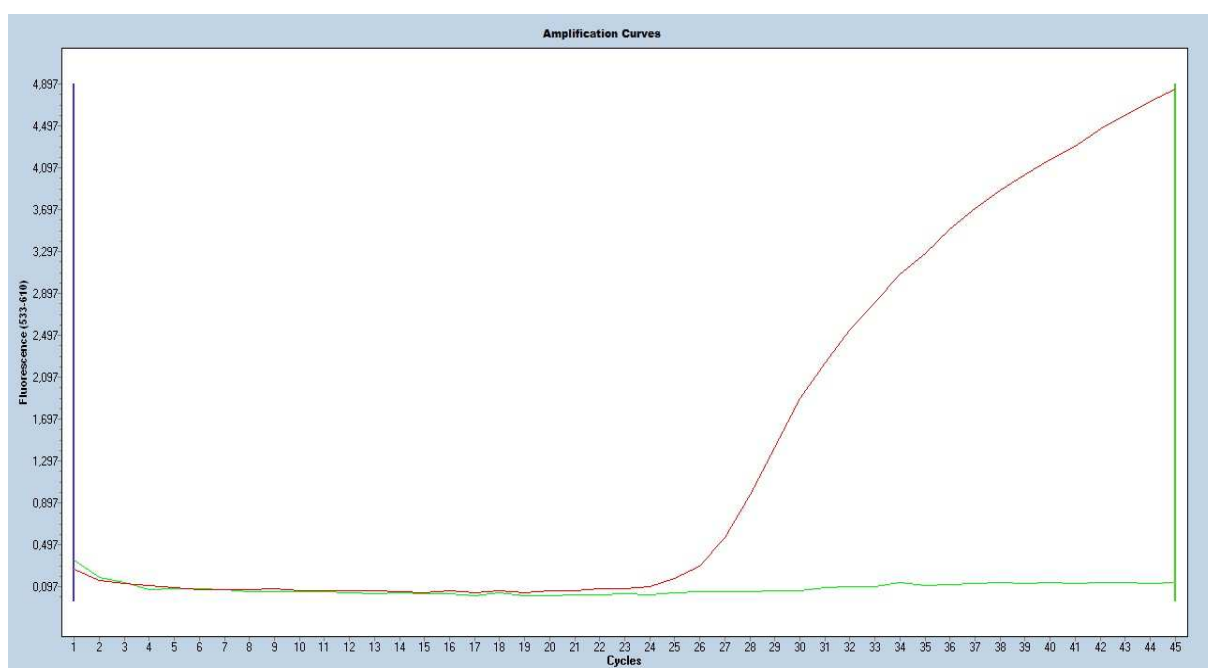


Figura 2: Esecuzione corretta del controllo positivo (rosso) e del controllo negativo (verde) (*Ureaplasma urealyticum/parvum*) sul LightCycler® 480II

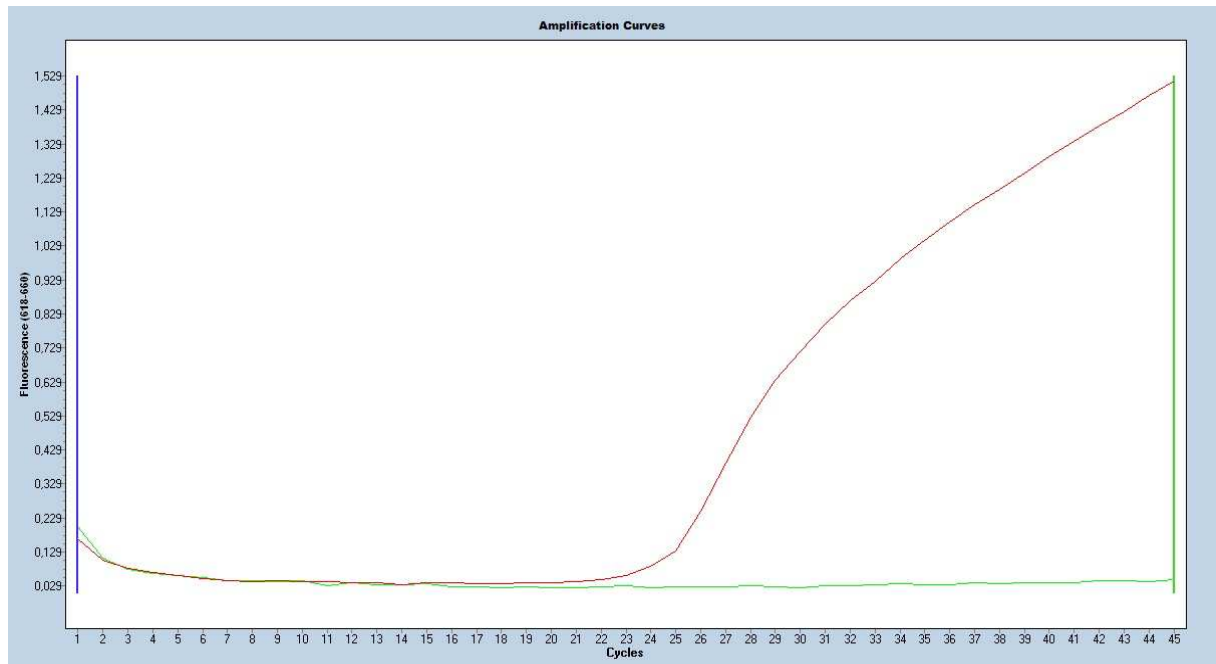


Figura 3: Esecuzione corretta del controllo positivo (rosso) e del controllo negativo (verde) (*Mycoplasma genitalium*) sul LightCycler® 480II

11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 11.

Tabella 11: Interpretazione del campione

Geni target			ICD	Risultato
<i>M. hominis</i>	<i>U. urealyticum/parvum</i>	<i>M. genitalium</i>		
Positivo	Negativo	Negativo	Positivo/ Negativo	<i>M. hominis</i> rivelato
Negativo	Positivo	Negativo	Positivo/ Negativo	<i>U. urealyticum/parvum</i> rivelato
Negativo	Negativo	Positivo	Positivo/ Negativo	<i>M. genitalium</i> rivelato
Positivo	Positivo	Negativo	Positivo/ Negativo	<i>M. hominis</i> e <i>U. urealyticum/parvum</i> rivelati
Positivo	Negativo	Positivo	Positivo/ Negativo	<i>M. hominis</i> e <i>M. genitalium</i> rivelati
Negativo	Positivo	Positivo	Positivo/ Negativo	<i>U. urealyticum/parvum</i> e <i>M. genitalium</i> rivelati
Positivo	Positivo	Positivo	Positivo/ Negativo	<i>M. hominis</i>, <i>U. urealyticum/parvum</i> e <i>M. genitalium</i> rivelati
Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Geni target non rivelati
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Non valido

Un campione è valutato come positivo se sia il DNA del campione sia l' **Internal Control DNA** mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

Un campione è valutato come positivo anche se il DNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma nessun segnale per l' **Internal Control DNA** nel sistema di rivelazione. La rivelazione del controllo di amplificazione interno non è necessaria, in quanto elevate concentrazioni dell'amplicone possono far sì che il segnale dell' **Internal Control DNA** sia debole o assente.

Un campione è valutato come negativo se il DNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione, ma è presente un segnale di amplificazione per l' **Internal Control DNA** nel sistema di rivelazione. La rivelazione dell' **Internal Control DNA** esclude l'inibizione della reazione di PCR.

Un campione non è valido se né il DNA del campione né l' **Internal Control DNA** mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rivelazione. In questo caso il campione contiene un inibitore della PCR o si è verificato un errore nella procedura di estrazione. Il campione estratto deve essere ulteriormente diluito

con acqua per PCR (1:10) e ri-amplificato, oppure occorre migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

12. Limiti del metodo

1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è convalidato solo per i tamponi genitali umani e i campioni di urina.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti patogeni nei campioni al di sotto della sensibilità analitica possono produrre falsi negativi.
4. La presenza di inibitori della PCR può causare risultati non validi.
5. Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame del primer o della sonda potrebbero influenzare la rivelazione di nuove varianti e causare un risultato falso negativo con il test RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel.
6. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, livelli estremamente bassi di target sotto il limite di rilevazione (LoD) possono essere rilevati, ma i risultati potrebbero non essere riproducibili.
7. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza dei geni target (16S-rRNA, IGS).
8. In caso di utilizzo di tamponi genitali, la mucina può mostrare proprietà di interferenza già in piccole quantità (validato nel canale *U. urealyticum/parvum*).

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Sensibilità analitica

Il test di PCR real time multiplex RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel ha un limite di rivelazione maggiore o uguale a 10 copie di DNA per reazione.

Le seguenti Figure 4, 5 e 6 mostrano serie di diluizioni di *M. hominis*, *U. urealyticum/parvum* e *M. genitalium* (ciascuno $10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl) sul LightCycler[®] 480II.

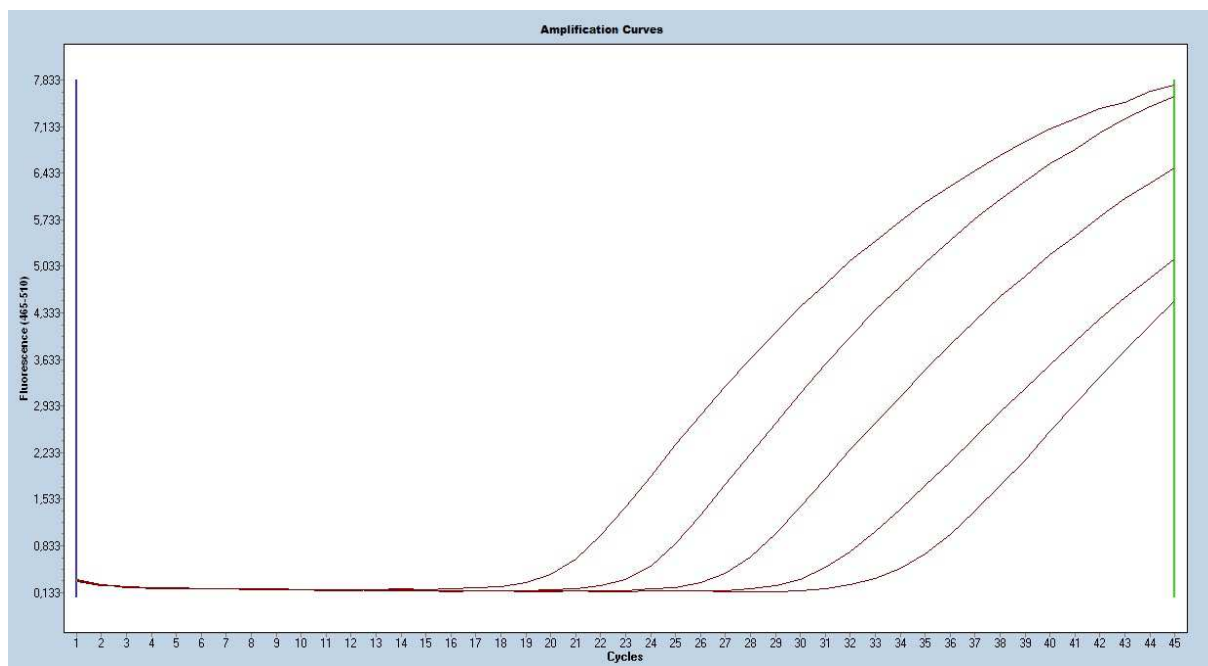


Figura 4: Serie di diluizioni di *Mycoplasma hominis* ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl) sul LightCycler[®] 480II

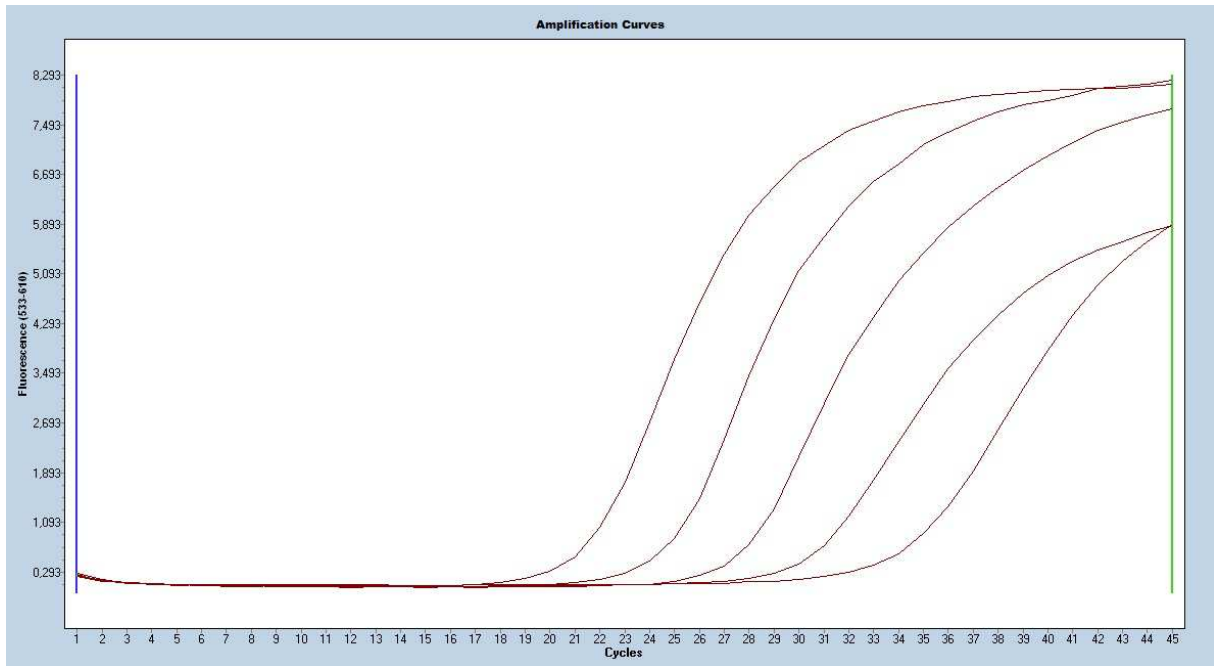


Figura 5: Serie di diluizioni di *Ureaplasma urealyticum/parvum* (10^5 - 10^1 copie di DNA per μ l) sul LightCycler[®] 480II

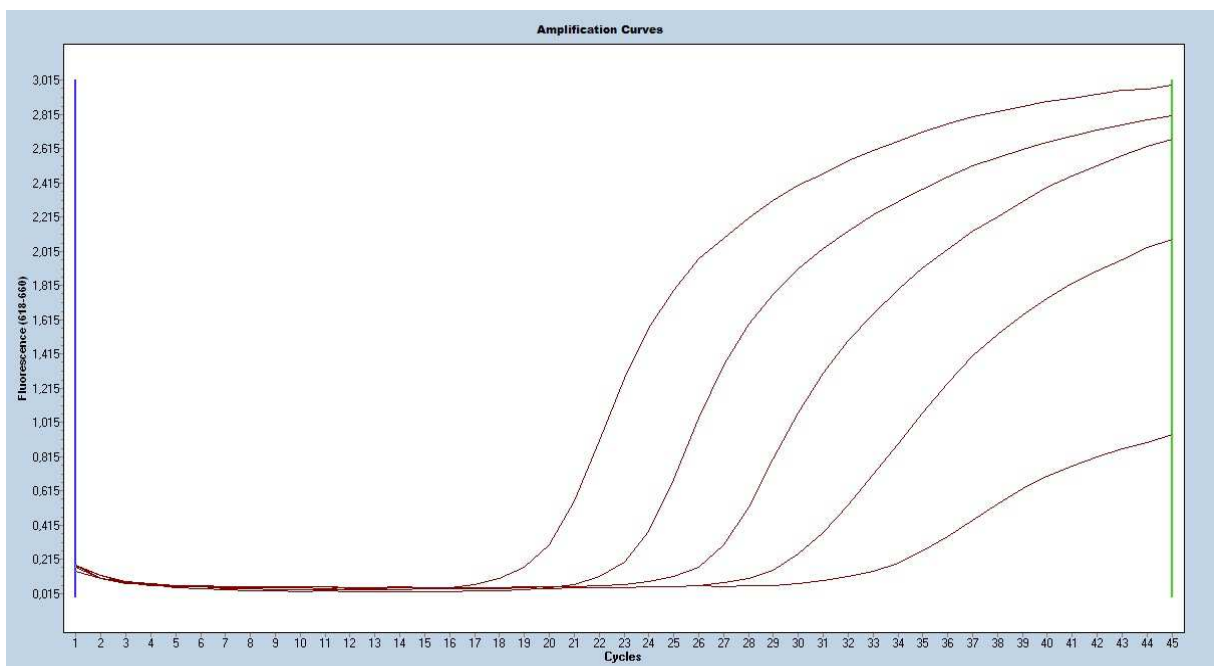


Figura 5: Serie di diluizioni di *Mycoplasma genitalium* (10^5 - 10^1 copie di DNA per μ l) sul LightCycler[®] 480II

Il limite di rivelabilità dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione del DNA e dalla concentrazione del DNA.

13.2 Specificità analitica

La specificità analitica del test di PCR real time multiplex RIDA® GENE STI Mycoplasma Panel è specifica per *M. hominis*, *U. urealyticum/parvum* e *M. genitalium*. Non è stata individuata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tabella 12):

Tabella 12: Test di reattività crociata

<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>	-	Treponema pallidum	-
<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 Reattività analitica

La reattività del test di PCR real time multiplex RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel è stata valutata rispetto a più sottotipi di *Mycoplasma* e *Ureaplasma* (vedere Tabella 13). I sottotipi elencati di seguito sono stati rivelati dal test di PCR real time RIDA[®] GENE STI Mycoplasma Panel:

Tabella 13: Test di reattività analitica










<i>Mycoplasma</i>			
<i>Mycoplasma hominis</i>			
Sierotipo 3	+	Sierotipo 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. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2019-07-23	Revisione generale 4. Contenuto della confezione 5. Istruzioni di conservazione 6. Reagenti e dispositivi aggiuntivi necessari 7. Precauzioni per gli utilizzatori 8. Raccolta e conservazione 9. Esecuzione del test 10. Controllo qualità 12. Limiti del metodo 13. Prestazioni e caratteristiche 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione dei simboli

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Diagnostica <i>in vitro</i>
	Leggere il foglio illustrativo
	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici nel test

Non pertinente

16. Bibliografia

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.