

Kit PCR multiplex pentru detectarea BTS (liliofilizat)

Manual de utilizare

Simbol	Descriere	Simbol	Descriere
	Conține suficiente materiale pentru <N> teste		Reprezentant autorizat în Uniunea Europeană
	Diagnostic in vitro		A se utiliza înainte de (data expirării)
	Număr lot		Limită de temperatură pentru depozitare
	Consultați instrucțiunile de utilizare înainte de folosire		Numele și adresa producătorului
	Data fabricației		Număr de referință (cod produs)

Denumire produs

Kit de detecție PCR multiplex pentru BTS (liliofilizat)

Dimensiune

16 teste/kit

Utilizare preconizată

Kitul este destinat detectării calitative a celor **14 agenți patogeni ai bolilor cu transmitere sexuală**, respectiv **HSV-1/2, UU, CT, NG, MG, MH, TV, TP, CA, GV, HD, UP și GBS**, din probe de exsudat genital feminin, exsudat uretral masculin sau lichid provenit din leziuni herpetice la pacienții suspecți de infecții cu transmitere sexuală. Acest kit este destinat **diagnosticului auxiliar** al bolilor cu transmitere sexuală și **nu poate fi utilizat ca reactiv de diagnostic in vitro (IVD) de rutină în practica clinică**.

Agenți patogeni

Virusul Herpes simplex (HSV) aparține subfamiliei α (alfa) a virusurilor din familia **Herpesviridae** umane și este un virus ADN liniar, dublu catenar, cu două tipuri: **HSV-1** și **HSV-2**. Herpesul simplex cauzat de infecția cu HSV este o afecțiune infecțioasă frecventă a pielii. Particulele virale HSV sunt sferice și sunt alcătuite din înveliș (envelopă), strat intermediar (tegument), nucleocapsidă și nucleu.

Ureaplasma urealyticum (UU) colonizează în principal tractul urinar și aparatul reproducător uman și reprezintă unul dintre agenții patogeni importanți ai bolilor cu transmitere sexuală. Ureaplasma urealyticum poate provoca nu numai infecții genitale, precum infecțiile vaginale și cervicale, ci este asociată și cu avortul spontan, infertilitatea și întârzierea creșterii intrauterine a fătului. Principala cale de transmitere este contactul sexual direct, însă infecția se poate transmite și prin contact indirect cu obiecte sau îmbrăcăminte contaminate.

Neisseria gonorrhoeae (NG), cunoscută și sub denumirea de gonococ, este o bacterie strict parazită pentru om, care se găsește frecvent în leucocitele din secrețiile purulente ale uretritei și vaginitei acute. Infecția cu *Neisseria gonorrhoeae* poate provoca infecții purulente ale aparatului urinar și reproducător și reprezintă una dintre cele mai frecvente boli cu transmitere sexuală. Manifestările clinice sunt, în principal, uretrita și cervicita. O metodă de laborator rapidă și precisă pentru detectarea infecțiilor gonococice este esențială pentru diagnosticarea și limitarea răspândirii gonoreei.

Chlamydia trachomatis (CT) este o bacterie patogenă intracelulară și una dintre principalele cauze ale infecțiilor genitale și oculare. Aceasta cuprinde trei biovaruri care infectează omul. Unul provoacă trahomul, cea mai frecventă cauză de orbire la nivel mondial, în special în Africa. Al doilea determină limfogranulomul venerian, o infecție cu transmitere sexuală întâlnită în special la bărbații care întrețin relații sexuale cu alți bărbați în țările dezvoltate. Al treilea biovar, format din serotipurile D-K, constituie obiectul acestui manual și reprezintă o cauză importantă de boală inflamatorie pelvină (PID), sarcină ectopică (EP) și infertilitate de cauză tubară (TFI) la femei, epididimită la bărbați, precum și conjunctivită și pneumonie neonatală la nou-născuți. *Chlamydia trachomatis* se transmite prin contact sexual oral, vaginal sau anal și poate fi transmisă de la mamă la copil în timpul nașterii pe cale vaginală.

Mycoplasma genitalium (MG) este un microorganism pretențios din clasa **Mollicutes**, fiind cel mai mic procariot capabil de replicare independentă. A fost izolat pentru prima dată în anul 1981, iar multe aspecte privind evoluția naturală a infecției netratate sunt încă insuficient cunoscute. Este recunoscut ca agent patogen cu transmitere sexuală, responsabil de uretrita non-gonococică acută și cronică la bărbați, existând tot mai multe dovezi că provoacă și cervicită și boală inflamatorie pelvină la femei.

Mycoplasma hominis (MH) face parte din flora normală a tractului genital, însă poate deveni un agent patogen subestimat, capabil să producă atât infecții genito-urinare, cât și infecții extragenitale, inclusiv la nou-născuți. Artrita septică, infecțiile protezelor articulare, infecțiile sistemului nervos central, endocardita infecțioasă și formarea de abcese sunt infecții extragenitale întâlnite în special la pacienții imunocompromiși. Lipoproteinele *Mycoplasma hominis* joacă un rol important în patogenitate și interacționează direct cu sistemul imunitar al gazdei.

Trichomonas vaginalis (TV) este probabil cea mai răspândită infecție cu transmitere sexuală de origine non-virală, afectând aproximativ 3,7 milioane de femei și bărbați în Statele Unite. Există diferențe semnificative între grupurile populaționale, persoanele afro-americane având un risc de peste patru ori mai mare de infecție comparativ cu alte grupuri etnice.

Candida albicans (CA) este o ciupercă comensală frecvent întâlnită, care colonizează cavitatea orofaringiană, tractul gastrointestinal, tractul vaginal și pielea persoanelor sănătoase. La aproximativ 50% din populație, *C. albicans* face parte din flora normală a microbiotei. Manifestările clinice produse de speciile de *Candida* variază de la infecții superficiale localizate ale pielii și mucoaselor până la infecții invazive care afectează mai multe organe și pot pune viața în pericol.

Gardnerella vaginalis (GV) este principala bacterie anaerobă responsabilă de vaginoza bacteriană (BV) la femei. Deși face parte din flora vaginală normală, proliferarea excesivă a acestei bacterii poate determina vaginoză bacteriană, principala cauză a secrețiilor vaginale anormale și a vaginitei. Infecția cu *Gardnerella vaginalis* poate avea consecințe importante asupra sănătății reproductive a femeii, crește susceptibilitatea la bolile cu transmitere sexuală și poate favoriza apariția complicațiilor în timpul sarcinii.

Treponema pallidum (TP) este agentul etiologic al sifilisului. Este un microorganism mic și mobil, care nu poate fi vizualizat prin microscopie optică obișnuită și nu poate fi cultivat în laborator. Agentul patogen poate fi identificat în lichidul cefalorahidian încă din stadiile timpurii ale bolii, iar neurosifilisul poate apărea în orice etapă după infectare.

Streptococcus agalactiae reprezintă **streptococul de grup B (GBS)**. Denumirea provine din clasificarea Lancefield, bazată pe antigenul glucidic specific al peretelui celular. Bacteria colonizează frecvent tractul genital și tractul gastrointestinal. Colonizarea cu GBS la femeile gravide reprezintă un factor major de risc pentru infecțiile nou-născutului și sugarului.

Haemophilus ducreyi (HD) este un coccobacil Gram-negativ de dimensiuni mici care produce ulcerarea genitală cunoscută sub denumirea de șancru moale (chancroid). Această boală crește riscul de transmitere și de infectare cu HIV-1. Prevalența exactă a bolii nu este cunoscută, deoarece diagnosticul se bazează adesea pe sindromul clinic al ulcerului genital, însă focare epidemice continuă să fie raportate în țările în curs de dezvoltare și în populațiile cu un număr mare de parteneri sexuali.

Ureaplasma parvum (UP) este unul dintre microorganismele cel mai frecvent implicate în corioamniotita clinică. Deși semnificația sa patogenă a fost discutată în unele situații, *Ureaplasma parvum* a fost asociată cu uretrita la bărbați, cervicita și vaginoza bacteriană la femei, precum și cu corioamniotita fetală și evoluția nefavorabilă a sarcinii.

Principiul de detecție

Acest produs este un sistem de detecție PCR **TaqMan**, bazat pe utilizarea sondelor fluorescente. ADN-ul agenților patogeni **HSV-1/2, UU, CT, NG, MG, MH, TV, TP, CA, GV, HD, UP și GBS** este amplificat direct prin tehnica **PCR în timp real (Real-Time PCR)**.

În timpul amplificării șablonului de ADN, sonda TaqMan este degradată datorită activității de polimerizare 5'→3' și a activității exonucleazice a ADN-polimerazei **Taq**. Ca urmare, fluoroforul (markerul fluorescent) este separat de molecula de stingere a fluorescenței (quencher), ceea ce permite aparatului să detecteze semnalul fluorescent generat.

Componentele kitului sunt organizate după cum urmează:

Tip/canal	Gena detectată			
	FAM	HEX	ROX	CY5
STD PCR Mix A	HSV-1	UU	HSV-2	CT
STD PCR Mix B	MH	HD	UP	MG
STD PCR Mix C	GV	TV	CA	GBS
STD PCR Mix D	TP	NG	-	gena de referință internă umană

Kitul utilizează o **genă de referință internă** pentru controlul calității pe întregul flux de lucru, începând cu recoltarea probei și până la obținerea rezultatului, contribuind astfel la prevenirea rezultatelor **fals negative**.

Conținutul kitului

Componentă	Ambalare	Specificație	Conținut (reactivi)
STD PCR Mix	8 tuburi × 0,2 ml, bandă cu 8 tuburi (liofilizate)	16 teste	dNTP-uri, MgCl ₂ , primeri, sonde fluorescente și ADN-polimerază Taq
Control pozitiv	4 tuburi × 0,2 ml (liofilizate)	4 × 40 μl	Plasmidă sau pseudovirus care conține fragmente specifice ale genelor HSV-1/2, UU, CT, NG, MG, MH, TV, TP, CA, GV, HD, UP, GBS și ale genei de control intern (IC)
Control negativ	Criotub de 1,5 ml	400 μl	Soluție de NaCl 0,9%
Soluție de reconstituire	Criotub de 2,0 ml	1600 μl	—

Depozitare și termen de valabilitate

1. Kitul poate fi transportat la **temperatură ambientală**.
2. Toate componentele kitului pot fi păstrate la o temperatură cuprinsă între **2°C și 30°C** pentru o perioadă îndelungată. **Termenul de valabilitate este de 12 luni**.
3. **Data fabricației și data expirării** sunt înscrise pe eticheta aplicată pe exteriorul cutiei.
4. Componentele liofilizate, după reconstituire, pot fi păstrate la **-20°C**. Acestea nu trebuie supuse la mai mult de **4 cicluri de congelare-decongelare**.

Aparatură

Pentru utilizarea acestui produs se recomandă instrumentele PCR tip **POCT** din seria **NAT-POS: NAT-POS S1 și NAT-POS S4.**

Recoltarea și manipularea probelor

(1) Exsudat genital feminin

- Pacienta **nu trebuie să urineze cu cel puțin 2 ore înainte de recoltare.**
- Contactele sexuale sunt interzise cu **24 de ore înainte de recoltare.**
- Introduceți peria pentru recoltare cervicală în colul uterin și rotiți-o ușor, în sensul acelor de ceasornic, de **4-5 ori.**
- Scoateți lent peria cervicală și introduceți-o în tubul de recoltare.
- Tubul conține deja soluția de conservare celulară.
- Rupeți mânerul periei la locul marcat, astfel încât capătul cu perii să rămână în tub.
- Închideți bine capacul, etichetați tubul cu numărul probei și trimiteți-l la laborator pentru analiză.

(2) Exsudat uretral masculin

- Folosiți un tampon steril de dimensiuni mici.
- Introduceți tamponul aproximativ **2-3 cm** în uretră.
- Rotiți ușor tamponul pentru a colecta secrețiile.
- Introduceți tamponul în tubul de recoltare care conține soluția de conservare.
- Pacientul **nu trebuie să urineze în cele 2 ore anterioare recoltării.**

(3) Lichid din leziuni herpetice

- Utilizați o seringă sterilă de unică folosință prevăzută cu ac.
- Aspirați **0,2 ml soluție PBS** (soluție salină tamponată cu fosfați).
- Introduceți acul prin membrana veziculei herpetice.
- Aspirați și reintroduceți lichidul de **2-3 ori** pentru omogenizare.
- Aspirați apoi conținutul leziunii.
- Transferați lichidul într-un tub pentru ser.
- Închideți ermetic tubul și trimiteți-l la laborator pentru analiză.

Păstrarea și transportul probelor

- Probele pot fi analizate **imediat după recoltare.**
- Dacă analiza nu poate fi efectuată imediat, acestea pot fi păstrate:
 - la **2-8°C** timp de **maximum 3 zile;**
 - la **-20°C** timp de **până la 6 luni;**
 - la **-70°C** timp de **până la 2 ani.**
- În timpul transportului trebuie evitate ciclurile repetate de congelare și decongelare.
- Probele trebuie transportate la temperatură scăzută, cu respectarea normelor de **biosecuritate**

Protocol

1. Pregătirea reactivilor

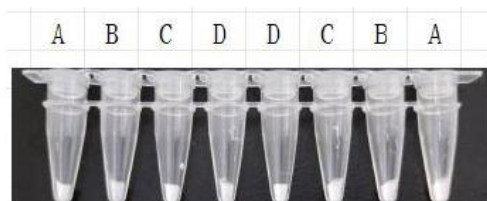
a) Kit în varianta liofilizată, cu benzi de câte 8 tuburi PCR

Scoateți din kit banda cu **8 tuburi PCR** care conține reactivul **STD PCR Mix** liofilizat.

Țintele de detecție corespunzătoare fiecărui amestec PCR din cele 8 tuburi ale benzii sunt prezentate în tabelul de mai jos.

Tubul 1	Tubul 2	Tubul 3	Tubul 4	Tubul 5	Tubul 6	Tubul 7	Tubul 8
PCR Mix A	PCR Mix B	PCR Mix C	PCR Mix D	PCR Mix D	PCR Mix C	PCR Mix B	PCR Mix A
HSV-1	GV	CT	MH	MH	CT	GV	HSV-1
TP	TV	UU	HD	HD	UU	TV	TP
HSV-2	CA	NG	UP	UP	NG	CA	HSV-2
IC	GBS	IC	MG	MG	IC	GBS	IC

Fiecare **bandă cu 8 tuburi PCR** este destinată efectuării a **două teste**. Fiecare test utilizează **4 tuburi PCR**, care conțin **PCR Mix A, PCR Mix B, PCR Mix C și PCR Mix D**. Separați banda cu 8 tuburi prin tăiere la mijloc, obținând astfel **două seturi independente**, fiecare corespunzând unui test.

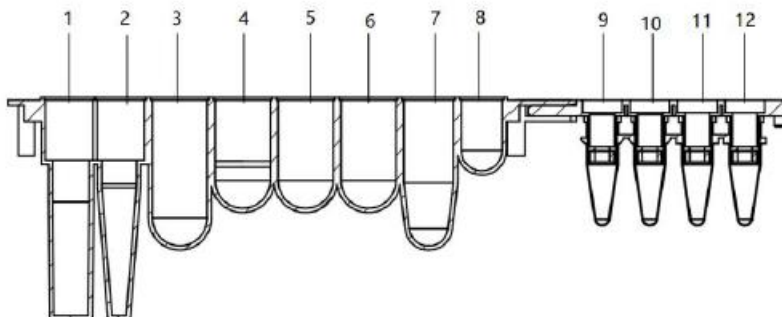


b) Control pozitiv

Adăugați **40 µL** de **soluție de reconstituire** într-un tub de control pozitiv pentru reconstituirea reactivului liofilizat. Omogenizați ușor prin agitare și centrifugați scurt, la viteză redusă.

2. Asamblarea cartușului

Luăți un set de **4 tuburi PCR** corespunzător unui test și îndepărtați cu grijă capacele tuburilor. Extrageți acizii nucleici (ADN-ul) din probă utilizând **kitul de extracție a acizilor nucleici**. Respectând instrucțiunile kitului de extracție, montați cele **4 tuburi PCR** în cartuș cu ajutorul adaptorului.



3. Adăugarea probei

Îndepărtați cu grijă folia de protecție a cartușului de extracție. Adăugați în **tubul nr. 3** al cartușului: **200 µL** soluție de probă sau **40 µL** control pozitiv sau **200 µL** control negativ.

Notă: Un cartuș poate fi utilizat pentru analiza **unei singure probe** sau a **unui singur control** (pozitiv sau negativ).

Testul de control poate fi efectuat săptămânal sau lunar.

4. Introducerea cartușului și rularea programului

1. Introduceți cartușul în instrumentul **NAT-POS** și asigurați-vă că acesta este fixat corespunzător în modulul de analiză.
2. În interfața principală, selectați „**Run**”, introduceți **numărul experimentului (Exp. Number)** și alegeți proiectul predefinit „**STD-14**”.
3. Porniți analiza apăsând butonul „**Run**”.



5. Analiza datelor

După finalizarea programului PCR, fișierele cu datele rezultate sunt salvate automat. Pentru interpretarea rezultatelor, setați parametrii de analiză și analizați separat rezultatele corespunzătoare canalelor FAM, HEX, ROX și CY5.

(1) Setarea liniei de bază (Baseline)

Linia de bază poate fi stabilită automat de software sau poate fi ajustată manual, în funcție de forma curbei de amplificare.

(2) Setarea pragului (Threshold)

Pragul de detecție poate fi stabilit automat de software sau poate fi ajustat manual, în funcție de forma curbei de amplificare.

6. Controlul calității

Sistemul **NAT-POS** permite efectuarea controlului calității prin analizarea **controlului negativ** și a **controlului pozitiv** o dată pe săptămână sau o dată pe lună, în funcție de frecvența de utilizare a instrumentului.

Controalele pozitiv și negativ asigură verificarea performanței testului și trebuie utilizate în cadrul procedurilor de control al calității.

Rezultatele sunt considerate **valide** numai dacă sunt îndeplinite toate condițiile prezentate mai jos. În caz contrar, testul este considerat **invalid**. În această situație trebuie verificate instrumentul, reactivii, condițiile de amplificare și orice alți factori care ar putea influența rezultatul, după care analiza trebuie repetată.

Controlul calității produsului	Tub STD PCR	Cerințe privind controlul calității			
		Canalul FAM	Canalul HEX	Canalul ROX	Canalul CY5
Control pozitiv	Mix A	Ct ≤ 32	Ct ≤ 32	Ct ≤ 32	Ct ≤ 32
	Mix B	Ct ≤ 32	Ct ≤ 32	Ct ≤ 32	Ct ≤ 32
	Mix C	Ct ≤ 32	Ct ≤ 32	Ct ≤ 32	Ct ≤ 32
	Mix D	Ct ≤ 32	Ct ≤ 32	-	Ct ≤ 32
Control negativ	Mix A	Undet	Undet	Undet	Undet
	Mix B	Undet	Undet	Undet	Undet
	Mix C	Undet	Undet	Undet	Undet
	Mix D	Undet	Undet	Undet	Undet sau Ct>38

7. Analiza rezultatelor testului

	Canal				Interpretarea rezultatelor
	FAM	HEX	ROX	CY5	
STD PCR Mix A	Ct≤38	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	MH Pozitiv
	Undet sau Ct>38	Ct≤38	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	UU Pozitiv
	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	Ct≤38	Undet sau Ct>38	HSV-2 Pozitiv
	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	Ct≤38	CT Pozitiv
STD PCR Mix B	Ct≤38	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	GV Pozitiv
	Undet sau Ct>38	Ct≤38	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	TV Pozitiv
	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	Ct≤38	Undet sau Ct>38	CA Pozitiv
	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	Ct≤38	GBS Pozitiv
STD PCR Mix C	Ct≤38	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	HSV-1 Pozitiv
	Undet sau Ct>38	Ct≤38	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	HD Pozitiv
	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	Ct≤38	Undet sau Ct>38	UP Pozitiv
	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	Ct≤38	MG Pozitiv
STD PCR Mix D	Ct≤38	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	TP Pozitiv
	Undet sau Ct>38	Ct≤38	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	NG Pozitiv
	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	Undet sau Ct>38	Ct≤32	IC valid
STD Mix D	Oricare	Oricare	-	Undet sau Ct>32	Retestare*

* Dacă valoarea Ct a controlului intern (canalul CY5 din STD Mix D) este „Undet” sau Ct > 32, rezultatele testului sunt considerate invalide, iar proba trebuie recoltată din nou și retestată.

Valoarea-prag sau intervalul de referință

Valorile-prag pentru HSV-1/2, UU, CT, NG, MG, MH, TV, TP, CA, GV, HD, UP și GBS sunt Ct ≤ 38.

Limitările testului

1. Acest kit este destinat detectării și identificării agenților patogeni ai bolilor cu transmitere sexuală: **HSV-1/2, UU, CT, NG, MG, MH, TV, TP, CA, GV, HD, UP și GBS**. Rezultatele obținute au **caracter orientativ** și trebuie interpretate împreună cu simptomele și semnele clinice ale pacientului, istoricul medical, rezultatele altor investigații de laborator și răspunsul la tratament.
2. Contaminarea mediului de laborator, a reactivilor sau contaminarea încrucișată în timpul manipulării probelor poate conduce la **rezultate fals pozitive**.
3. Un rezultat negativ pentru **HSV-1/2, UU, CT, NG, MG, MH, TV, TP, CA, GV, HD, UP și GBS** nu exclude posibilitatea unei infecții aflate într-un stadiu incipient sau în perioada de convalescență (recuperare).
4. Deși kitul detectează regiuni conservate ale genelor **HSV-1/2, UU, CT, NG, MG, MH, TV, TP, CA, GV, HD, UP și GBS**, din punct de vedere teoretic nu poate fi exclusă complet posibilitatea ca unele variante rare, care prezintă mutații în aceste regiuni conservate, să nu fie detectate.

Caracteristici de performanță

- **Rata de concordanță a controlului negativ:** toate cele 8 probe de referință interne (T1–T8) au avut rezultat negativ, obținându-se o rată de concordanță de **100% (8/8)**.
- **Rata de concordanță a controlului pozitiv:** toate probele au avut rezultat pozitiv.
- **Rata de concordanță pentru probe slab pozitive:** **95%** (N ≥ 20).
- **Rata de concordanță pentru probe moderat pozitive:** **100%** (N ≥ 20).
- **Limita de detecție:** 500 copii/mL sau 5 copii/reacție.

- **Repetabilitate:** proba internă de referință (J1) a fost pozitivă în 10 determinări repetate, iar coeficientul de variație (CV) al valorii Ct a fost **mai mic de 5,0%**.
- **Acuratețe:** coeficientul de variație (CV) al valorii Ct a fost **sub 5,0%**, în condițiile efectuării testului timp de 5 zile consecutive, cu câte două determinări pe zi pentru fiecare operator și patru repetări pentru fiecare probă.
- **Specificitate (interferențe):** nu s-au observat interferențe nespecifice din partea altor agenți patogeni, inclusiv **virusul hepatitei B (HBV)**, **virusul hepatitei C (HCV)**, **virusul Epstein-Barr (EBV)** și **citomegalovirusul (CMV)**.

Atenționări

1. Acest kit este destinat **exclusiv diagnosticului auxiliar in vitro**. Diagnosticul clinic și tratamentul pacientului trebuie stabilite pe baza simptomelor și semnelor clinice, a istoricului medical, a rezultatelor altor investigații de laborator și a răspunsului la tratament.
2. Înainte de efectuarea testului, citiți cu atenție prezentul manual de utilizare și respectați cu strictețe toate etapele procedurii.
3. Recoltarea, transportul, depozitarea sau prelucrarea necorespunzătoare a probelor pot conduce la rezultate incorecte. Dacă procesul de manipulare a probelor nu este controlat corespunzător, poate apărea contaminarea încrucișată, ceea ce poate genera **rezultate fals pozitive**.