

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

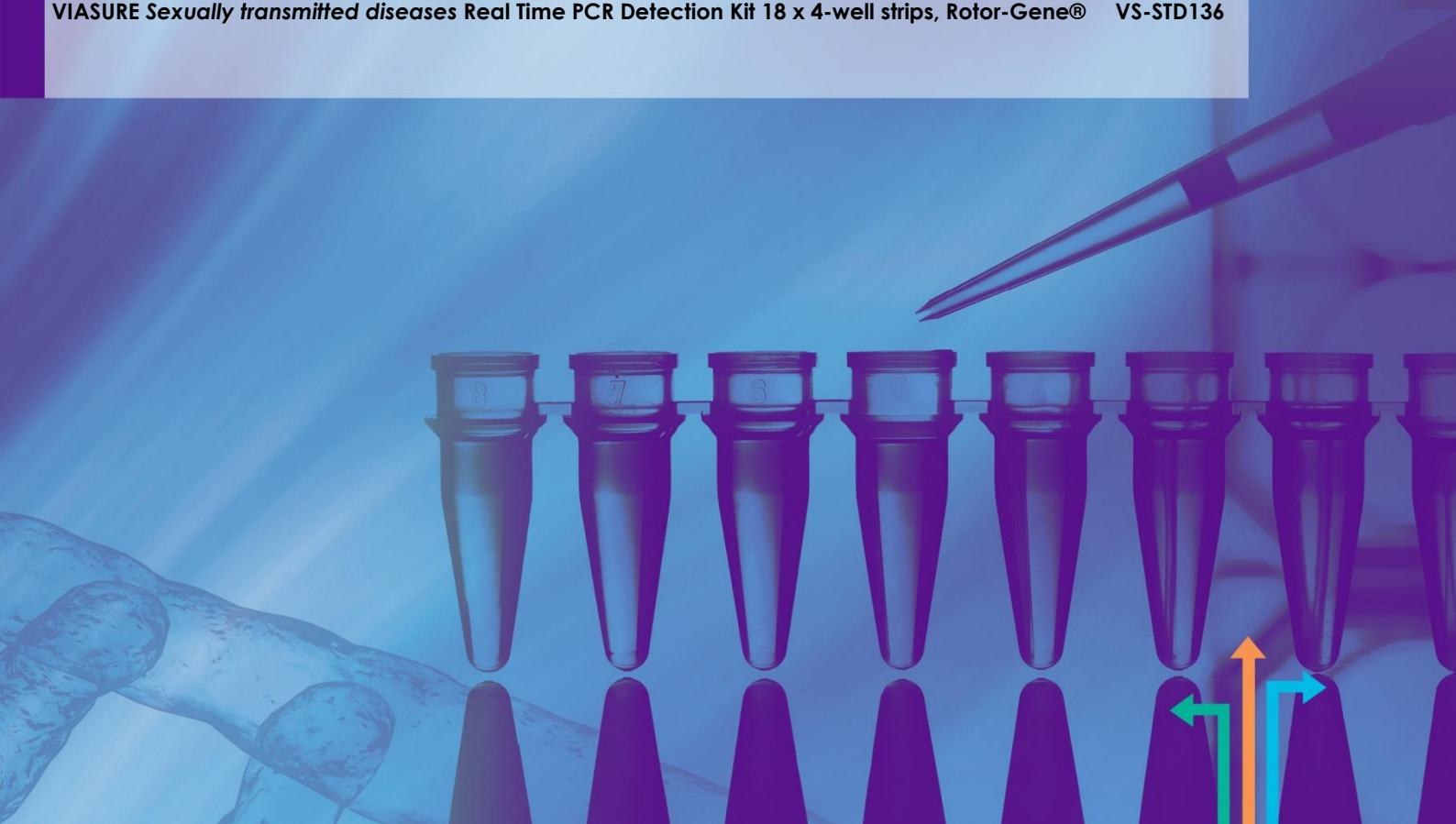
by CerTest
BIOTEC

Sexually Transmitted Diseases

Handbook for the following references/

Manual para las siguientes referencias:

VIASURE <i>Sexually transmitted diseases</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-STD106L
VIASURE <i>Sexually transmitted diseases</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-STD106H
VIASURE <i>Sexually transmitted diseases</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-STD112L
VIASURE <i>Sexually transmitted diseases</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-STD112H
VIASURE <i>Sexually transmitted diseases</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-STD136



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific identification and differentiation of *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and/or *Mycoplasma hominis*, in urogenital, endocervical and urine samples from patients with signs and symptoms of sexually transmitted diseases (STDs). This test is intended for use as an aid in the diagnosis of STDs in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from clinical specimens, multiplied using Real Time amplification and detected using fluorescent reporter dye probes specific for *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma hominis*.

2. Summary and Explanation

Sexually transmitted infections (STIs) represent a group of diseases that affect the sexual and reproductive health of millions of people, being a public problem of interest. Etiological agents responsible for STIs include fungi, bacteria, parasites and viruses. Some of these microorganisms are eliminated after a period of time, while others are recurrent and some remain in the body asymptotically, allowing the progress of the disease and generating consequences such as inflammations of the genito-urinary tract, infertility and even the development of cancer.

Trichomonas vaginalis infection is one of the most common sexually transmitted diseases (STDs) in the world. *Trichomonas vaginalis* is a flagellated pathogen protozoan belonging to the order *Trichomonadida* located in both, male and female urogenital tract but it has also been isolated from the respiratory tract of infants and adults. In women it can be found in the vagina and in the urethra, while in men it can be found in the urethra, the prostate and the epididymis. *Trichomonas vaginalis* infection has been associated with vaginitis, cervicitis and urethritis, premature rupture of membranes and premature delivery in pregnant women. *Trichomonas vaginalis* infection has also been associated with an increased risk of HIV acquisition and transmission in women.

Among other sexually transmitted pathogens, four species of bacteria of the genus *Mycoplasma* can be found (*Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*) whose presence can also lead to various infections of the genitourinary tract in humans.

Mycoplasma hominis colonizes the lower urogenital tract and is associated with urogenital infections, particularly bacterial vaginosis and non-gonococcal urethritis. It is also involved in extra genital infections, such as postpartum or post-abortion fever, in post-cesarean wound infections or after a hysterectomy. In neonates, it can cause meningitis, brain abscesses and eye infections. In adults, bacteremia, septic arthritis, osteitis, endocarditis, mediastinitis, brain abscesses and respiratory infections have been described. Most patients have predisposing factors, including immunosuppression, trauma, respiratory problems or post-manipulation and/or surgery of the genitourinary tract. It is considered a bacterium present in the normal micro flora in 20% of the male population and in 40% of the female population.



Mycoplasma genitalium is a facultative anaerobic organism and a recognized cause of nongonococcal urethritis in men. In women, *M. genitalium* has been associated with cervicitis, endometritis, pelvic inflammatory disease (PID), infertility, susceptibility to human immunodeficiency virus (HIV), and adverse birth outcomes, indicating a consistent relationship with female genital tract pathology. The long-term reproductive consequences of *M. genitalium* infection in asymptomatic individuals need to be investigated further.

Ureaplasma spp. are often isolated from human genital mucosa of individuals with a lack of symptoms. In humans, two major species, namely *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* (family *Mycoplasmataceae*, genus *Ureaplasma*) are part of the genital flora of men and women and are present in almost 70% of sexually active population. These bacteria cause inflammation and lead to chorioamnionitis, preterm deliveries, and premature rupture of membranes. Recently, their pathogenic roles on spermatogenesis and subsequent male infertility have been also suggested. Although both male and female carriers are asymptomatic, *Ureaplasma* spp. is occasionally isolated from the neonatal lesions of bronchopulmonary dysplasia, intraventricular haemorrhage, and necrotizing enterocolitis.

Neisseria gonorrhoeae is an obligate human pathogen and is the etiological agent of gonorrhoea. Syndromes include cervicitis in women, and urethritis, pharyngitis and proctitis in both sexes. If untreated, women may experience severe sequelae of pelvic inflammatory disease, chronic pelvic pain, ectopic pregnancy and tubal infertility, while men may develop epididymitis, prostatitis and urethral stricture.

Chlamydia trachomatis is a small intracellular bacterium that requires living cells to multiply. There are 18 serotypes; D-K are the ones that cause sexually transmitted infections, as well as neonatal infections. The majority of genital chlamydial infections in both males and females are asymptomatic. When symptoms do occur, lower urogenital tract infection can manifest as cervicitis in females and urethritis in males and females. Whether symptomatic or asymptomatic, untreated chlamydia can ascend to the upper genital tract. In males, this can cause epididymitis, which is not thought to be an important cause of long-term sequelae. However, in females, upper tract infection can result in pelvic inflammatory disease (PID), a spectrum of clinical disorders involving infection and inflammation of the uterus, fallopian tubes, ovaries, or adjacent peritoneum.

Conventional diagnostic assays, lack sensitivity, require viable organisms and thus special shipment conditions and, sometimes, invasive sampling. As nucleic acid amplification tests, as real time PCR, allow us to overcome some of these limitations. Several molecular diagnostic assays have recently been commercialized to assist the syndromic diagnosis of STIs. In addition, their implicit multiplexing capacity allows for the detection of multiple pathogens in a single sample.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Sexually Transmitted Diseases* Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific identification and differentiation of *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and/or *Mycoplasma hominis*, in urogenital, endocervical and urine samples from patients with signs and symptoms of sexually transmitted diseases (STDs). After DNA isolation, the identification of the STDs is performed by the amplification of a conserved region of the *T. vaginalis*-specific 2-kb repeated sequence, (*Trichomonas vaginalis*), *ureasa* gene (*Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*),



yidC gene (*Mycoplasma hominis*), *porA* and *Opa* genes (*Neisseria gonorrhoeae*), a region within ORF2 of the chlamydial plasmid (*Chlamydia trachomatis*) and *MgPa adhesin* gene (*Mycoplasma genitalium*), using specific primers and a fluorescent-labelled probe.

VIASURE *Sexually Transmitted Diseases* Real Time PCR Detection Kit is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of target template. This fluorescence could be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *Sexually Transmitted Diseases* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase) in an stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. Each kit includes two kinds of strips and each one corresponds to one different assay. The first strip contains the multiplex reaction mix for the detection of *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* & *Mycoplasma genitalium* 8/4-well strips). *Neisseria gonorrhoeae* DNA targets are amplified and detected in ROX channel, *Chlamydia trachomatis* DNA targets are amplified and detected in FAM channel and *Mycoplasma genitalium* DNA targets are amplified and detected in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2). The first strip (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* & *Mycoplasma genitalium* 8/4-well strips) contains an internal control (IC) which is amplified and detected in Cy5 channel. The second strip contains the multiplex reaction mix for the detection of *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma hominis* (*Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* & *Mycoplasma hominis* 8/4-well strips). *Trichomonas vaginalis* DNA targets are amplified and detected in FAM channel, *Ureaplasma urealyticum* DNA targets are amplified and detected in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2), *Ureaplasma parvum* DNA targets are amplified and detected in ROX channel and *Mycoplasma hominis* DNA targets are amplified and detected in Cy5 channel.

4. Reagents provided

VIASURE *Sexually Transmitted Diseases* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables 1 and 2. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table 1 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices (See Annex 1). Table 2 materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips.



Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> & <i>Mycoplasma genitalium</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	3/6 x 8-well strip
<i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Ureaplasma parvum</i> & <i>Mycoplasma hominis</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs in stabilized format	White	3/6 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
Sexual Transmitted Diseases Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 X 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-STD106L, VS-STD106H, VS-STD112L and VS-STD112H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> & <i>Mycoplasma genitalium</i> 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	Transparent	9 x 4-well strip
<i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Ureaplasma parvum</i> & <i>Mycoplasma hominis</i> 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs in stabilized format	Transparent	9 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
Sexual Transmitted Diseases Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	18 X 4-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-STD136. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- DNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortex.



- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments).

VIASURE *Sexually Transmitted Diseases* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid) and Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer. When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506).

To check thermocycler compatibility, see Annex 1, to check most common detection channels see Annex 2 and to check optical measurement exposure setting see Annex 3.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

- The product is indented for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- Do not use past expiration date.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (if available, Ref. VS-STD136). Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different envelopes and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- For VS-STD136 (compatible for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments) use the loading block to pipette reagents and samples into each tube and to help with fitting caps properly and avoid cross contamination.
- Make sure to use a well for determining *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* and another well for determining *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma hominis*. Be careful not to mix them throughout the process.



- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Consult safety data sheets, upon request.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.
- The product VIASURE *Sexually Transmitted diseases* Real Time PCR Detection kit has only been validated with the equipment mentioned in Section 5 of these Instructions for Use. The rest of the compatible Real Time PCR instrument indicated in Annex 1 is based on bibliographic data.

8. Test procedure

8.1. Sample preparation

Clinical specimens (urogenital specimens, urine samples, rectal and endocervical samples) should be collected in clean containers and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. We recommend to use fresh samples.

For longer storage, the samples should be frozen at -20°C . In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing. Homogenize sample as thoroughly as possible prior to preparation. Freezing and thawing cycles are not recommended.

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of the extraction kit used.

8.1.1. DNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of the extraction kit used.

For DNA extraction from clinical samples you can use your manual or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available DNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions.

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- ZP02006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit, using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).
- US121 NX-48 Urine/Swab DNA Kit using the Nextactor® NX-48 (Genolution Inc.).



- MagDEA® Dx SV, using magLEAD® 6gC (Precision System Science)).
- NucleoSpin® RNA Virus (MACHEREY-NAGEL).
- NucleoMag® Pathogen (MACHEREY-NAGEL).
- STARMag 96x4 Universal Cartridge Kit (Seegene, Korea)
- Microlab STAR Let automatic extraction system (Hamilton, Switzerland)
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

8.2. Lyophilized positive control

Sexually Transmitted Diseases Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Sexually Transmitted Diseases* Positive Control (red vial) by adding 200 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

8.3. PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from plates or strips.

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA extracted from each sample, reconstituted *Sexually Transmitted Diseases* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps. It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate, or gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes (for Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 1) Set up the thermocycler (to check compatibility see Annex 1).

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table 3. PCR protocol



Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*Trichomonas vaginalis* and *Chlamydia trachomatis*), HEX, JOE or VIC (*Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium*), ROX (*Ureaplasma parvum* and *Neisseria gonorrhoeae*), and Cy5 channels (*Mycoplasma hominis* and Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Result interpretation

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in negative control well and the presence of signal for *Sexually Transmitted Diseases* Positive Control well. The analysis of the samples is done by the software itself of the used real time PCR equipment according to manufacturer's instructions.

Interpretation of results for *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* & *Mycoplasma genitalium* 4/8-well strips:

- A sample is considered positive for ***Chlamydia trachomatis*** if there is an amplification signal in FAM channel, the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.
- A sample is considered positive for ***Neisseria gonorrhoeae*** if there is an amplification signal in ROX channel, the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.
- A sample is considered positive for ***Mycoplasma genitalium*** if there is an amplification signal in HEX channel, the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.
- A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive.
- The experiment is considered failed if there is an amplification signal in the Negative Control well and/or there is not amplification signal in the Positive Control well. We recommend to repeat the assay again.
- In case of absence of internal control signal in sample wells we recommend to repeat the assay diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible problems of inhibition.

Interpretation of results for *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* & *Mycoplasma hominis* 4/8-well strips:



- A sample is considered positive for *Trichomonas vaginalis* if there is an amplification signal in FAM channel and the Ct value obtained is less than 40.
- A sample is considered positive for *Ureaplasma urealyticum* if there is an amplification signal in HEX/VIC/JOE channel and the Ct value obtained is less than 40.
- A sample is considered positive for *Ureaplasma parvum* if there is an amplification signal in ROX channel and the Ct value obtained is less than 40.
- A sample is considered positive for *Mycoplasma hominis* if there is an amplification signal in Cy5 channel and the Ct value obtained is less than 40.
- A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system.
- The experiment is considered failed if there is an amplification signal in the Negative Control well and/or there is not amplification signal in the Positive Control well. We recommend to repeat the assay again.

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* & *Mycoplasma genitalium*).

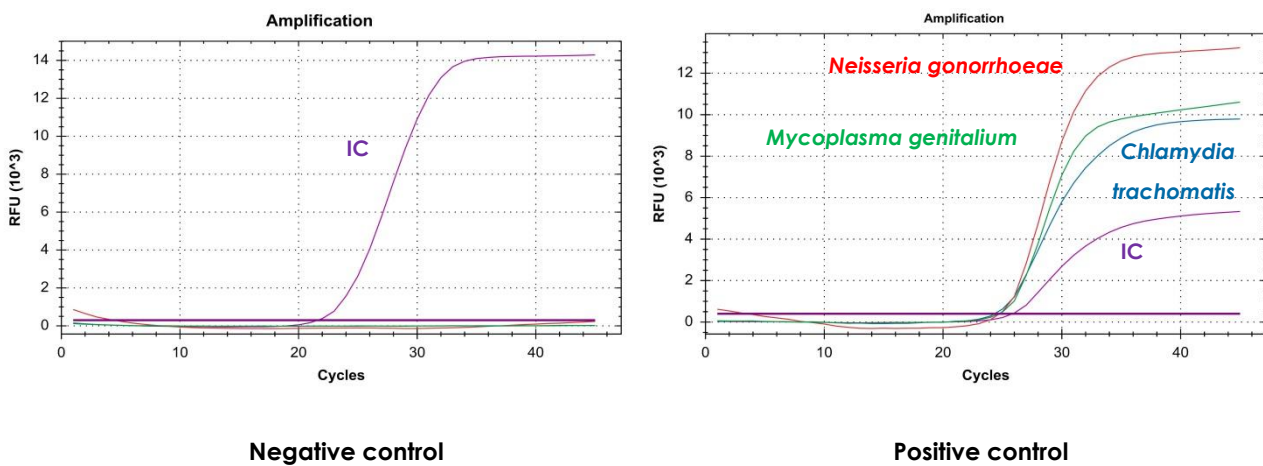
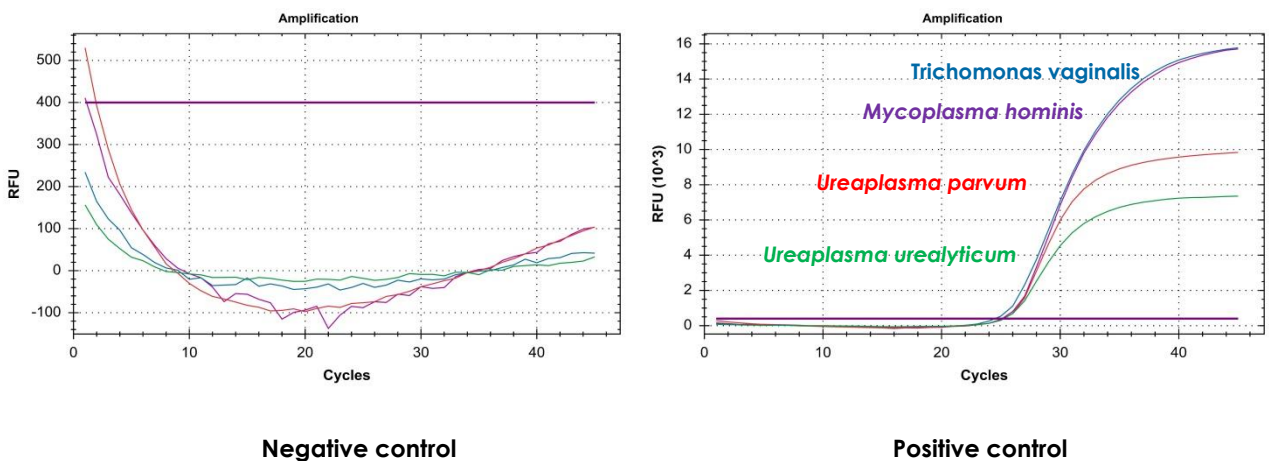


Figure 2. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* & *Mycoplasma hominis*).



The result is considered invalid if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. We recommend to repeat the assay again.

In case of absence of internal control signal in sample wells we recommend to repeat the assay diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible problems of inhibition.

In case of a doubtful interpretation result, it is recommended to verify the correct performance of each of the steps and review the parameters and the sigmoid shape of the curve. If the situation is not solved, it is recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated only with DNA extracted from urogenital specimens and endocervical specimens for *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma hominis*, rectal specimens (rectal-vaginal specimens and rectal samples) for *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis*; and urine samples for *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma hominis*.
- ON 0318 only intervenes in the conformity assessment of the test for *Chlamydia trachomatis*. The scope of the CE certification covers the detection of *Chlamydia trachomatis* from urine samples and urogenital and endocervical swabs. The detection of *Chlamydia trachomatis* in pharyngeal, semen, serum and rectal, urethral and vaginal swabs are out of the scope of certification by ON 0318. The rest of the pathogens have self-certification for CE marking.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from clinical samples must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by contamination by Sexually Transmitted Diseases, either samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

VIASURE *Sexually Transmitted Diseases* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the internal control (IC) in each well confirms the correct performance of the technique.



12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *Sexually Transmitted Diseases* Real Time PCR Detection Kit was tested using 948 different specimens first-void urines, rectal swabs, urethral swabs, endocervical swabs/exudate, vaginal swabs and pharyngeal swabs from symptomatic patients. Of all the analyzed samples, 46 discordant samples were obtained. These discrepancies were mainly observed in samples close to the limit of detection.

These results of both Multiplex reactions were compared with those obtained with a molecular detection method (Allplex™ STI Essential Assay (Seegene)). Of the 46 discordant samples, it was possible to solve the discrepancy using FTD Urethritis plus (Fast Track Diagnostics) in 35 samples, the rest could not be re-analysed for lack of sample.

The results were as follows:

VIASURE <i>Sexually Transmitted Diseases</i> Real Time PCR Detection Kit	Allplex™ STI Essential Assay (Seegene)			
		+	-	Total
	+	19	1	20
	-	1	927	928
	Total	20	928	948

Table 4. Comparative results for *Neisseria gonorrhoeae*.

VIASURE <i>Sexually Transmitted Diseases</i> Real Time PCR Detection Kit	Allplex™ STI Essential Assay (Seegene)			
		+	-	Total
	+	68	3	71
	-	2	875	877
	Total	70	878	948

Table 5. Comparative results for *Chlamydia trachomatis*.

VIASURE <i>Sexually Transmitted Diseases</i> Real Time PCR Detection Kit	Allplex™ STI Essential Assay (Seegene)			
		+	-	Total
	+	28	1	29
	-	2	917	918
	Total	30	918	948

Table 6. Comparative results for *Mycoplasma genitalium*.



VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit	Allplex™ STI Essential Assay (Seegene)			
		+	-	Total
	+	20	3	23
	-	0	925	925
	Total	20	928	948

Table 7. Comparative results for *Trichomonas vaginalis*.

VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit	Allplex™ STI Essential Assay (Seegene)			
		+	-	Total
	+	166	6	172
	-	7	769	776
	Total	173	775	948

Table 8. Comparative results for *Ureaplasma urealyticum*.

VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit	Allplex™ STI Essential Assay (Seegene)			
		+	-	Total
	+	402	13	415
	-	5	528	533
	Total	407	541	948

Table 9. Comparative results for *Ureaplasma parvum*.

VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit	Allplex™ STI Essential Assay (Seegene)			
		+	-	Total
	+	183	2	185
	-	0	763	763
	Total	183	765	948

Table 10. Comparative results for *Mycoplasma hominis*.

Sensitivity, specificity, PPV and NPV values for VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR detection kit (CerTest Biotec) compared with Allplex™ STI Essential Assay (Seegene) are shown in next table:



Microorganism	SE (%)	SP (%)	VPP (%)	VPN (%)
<i>C. trachomatis</i>	97.14	99.6	95.77	99.77
<i>M. genitalium</i>	93.33	99.89	96.55	99.78
<i>N. gonorrhoeae</i>	95	99.89	95	99.79
<i>T. vaginalis</i>	100	99.68	86.96	100
<i>U. urealyticum</i>	95.95	99.23	96.51	99.1
<i>U. parvum</i>	98.77	97.6	96.87	99.06
<i>M. hominis</i>	100	99.74	98.92	100

Table 11. Sensitivity, specificity, PPV and NPV values for VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR detection kit.

In conclusion, the results show a high sensitivity and specificity to detect sexually transmitted diseases using VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction (Figure 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9).

Figure 3. Dilution series of *Trichomonas vaginalis* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* & *Mycoplasma hominis*, channel FAM)

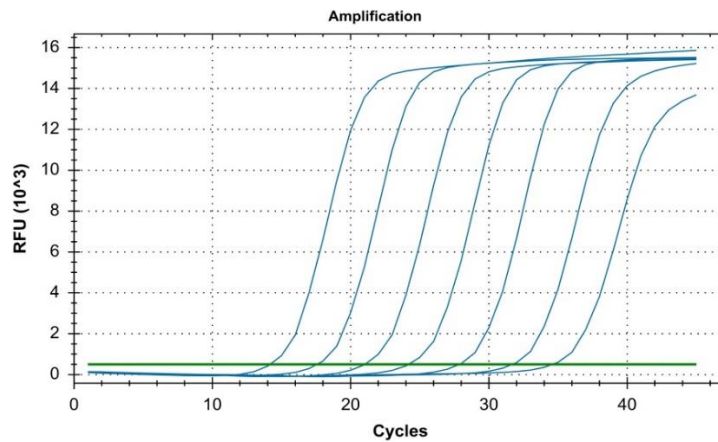


Figure 4 Dilution series of *Ureaplasma urealyticum* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* & *Mycoplasma hominis*, channel HEX)

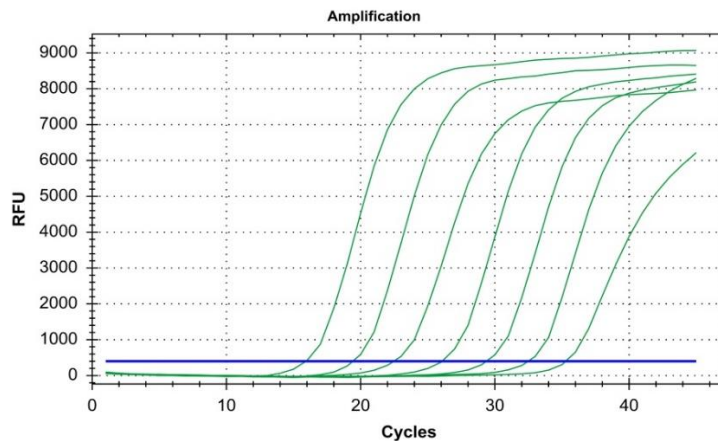


Figure 5. Dilution series of *Ureaplasma parvum* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* & *Mycoplasma hominis*, channel ROX).

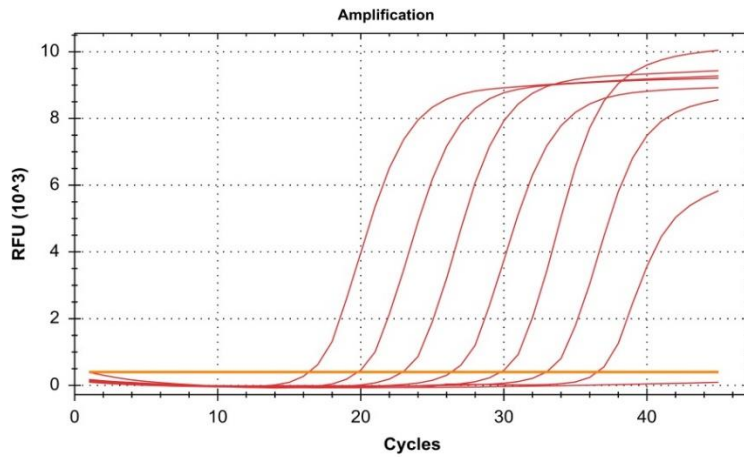


Figure 6. Dilution series of *Mycoplasma hominis* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* & *Mycoplasma hominis*, channel Cy5).

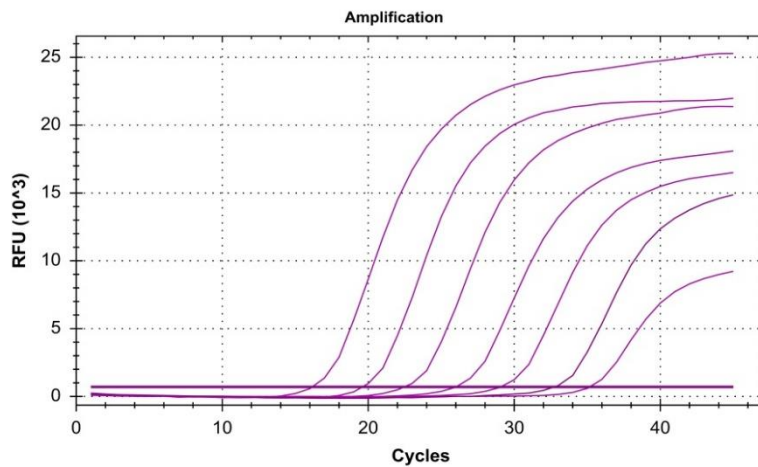


Figure 7. Dilution series of *Chlamydia trachomatis* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* & *Mycoplasma genitalium*, channel FAM).

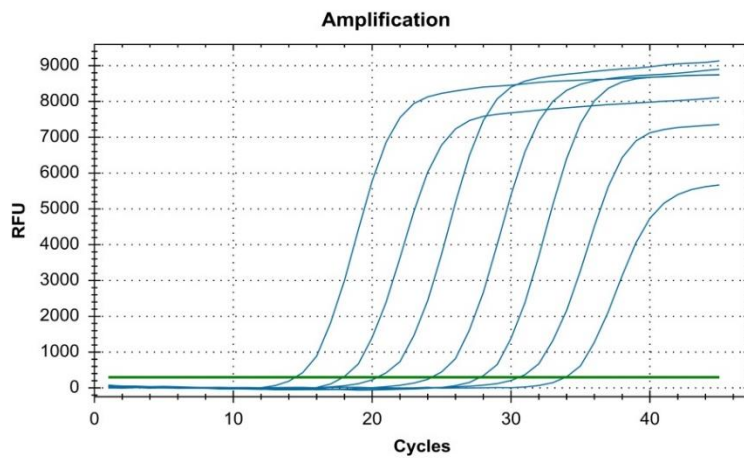


Figure 8. Dilution series of *Mycoplasma genitalium* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* & *Mycoplasma genitalium*, channel HEX).

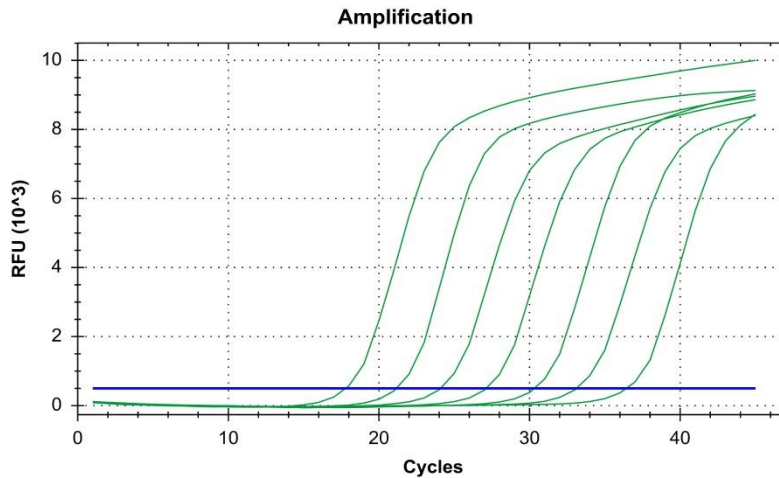
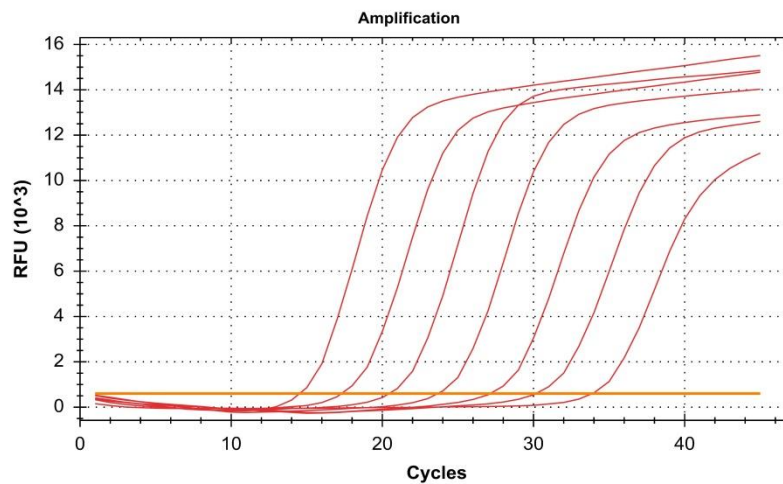


Figure 9. Dilution series of *Neisseria gonorrhoeae* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* & *Mycoplasma genitalium*, channel ROX).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the Sexually Transmitted Diseases assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common Sexually Transmitted Diseases pathogens. No cross-reactivity was detected against any of the following microorganisms tested:



Cross-reactivity testing					
<i>Candida parapsilosis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	<i>Escherichia coli</i> 0.1285; O18:H7:K1	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Candida krusei</i>	-	<i>Haemophilus influenza</i> MinnA	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
<i>Candida dubliniensis</i>	-	<i>Haemophilus ducreyi</i> class 1	-	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Listeria ivanovii</i>	-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-/+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Ureaplasma parvum</i>	-/+
<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV)	-/+	<i>Listeria innocua</i>	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-/+
<i>Chlamydia trachomatis</i> (SW)	-/+	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-/+	Cytomegalovirus	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> (Genovar F)	-/+	<i>Mycoplasma hominis</i>	-/+	Herpes simplex virus 1	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-/+	Herpes simplex virus 2	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	Human papillomavirus 16	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-	Human papillomavirus 18	-

Table 12. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit for *Neisseria gonorrhoeae* was evaluated against *Neisseria gonorrhoeae* strains St 49226 and Lvl Ng PorA, showing positive result.

The reactivity of VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit for *Chlamydia trachomatis* was evaluated against *Chlamydia trachomatis* (SW and LGV), Swedish strain, and Genovar F, and Serovars D, E, I, K and J; showing positive result.

The reactivity of VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit for *Mycoplasma genitalium* was evaluated against *Mycoplasma genitalium* showing positive result.

The reactivity of VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit for *Trichomonas vaginalis* was evaluated against *Trichomonas vaginalis* showing positive result.

The reactivity of VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit for *Ureaplasma urealyticum* was evaluated against *Ureaplasma urealyticum* showing positive result.

The reactivity of VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit for *Ureaplasma parvum* was evaluated against *Ureaplasma parvum* showing positive result.

The reactivity of VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit for *Mycoplasma hominis* was evaluated against *Mycoplasma hominis* showing positive result.



ANNEX 1

COMPATIBILITY WITH THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

Low profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a low profile block, like the systems listed in table A.1. High profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a high or regular profile block, like the systems listed in table A.2. If you do not find your thermocycler in the list below, please contact with your supplier.

Table A.1 LOW PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	Optical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well / CFX96™ Deep Well IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System

(1) Select Ramp Speed "Standard".
 (2) See Annex 3 to check optical measurement exposure setting.
 (3) The product should be reconstituted following the appropriate procedure (see Test Procedure) and transferred into the specific Rotor-Gene® Q or SmartCycler® tubes.
 (4) Shell Frame grid plate which fits in these Roche qPCR System is necessary.
 (5) No detection in Cy5 channel.
 (6) Detection in FAM and HEX channels only.

Table A1/A2. Compatible low and high profile Real Time PCR systems.



ANNEX 2

DETECTION CHANNELS FOR THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

The fluorescence detection channels for some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in Table A3.

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	VIASURE CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, in the Settings menu, select the option Apply Fluorescence Drift Correction for Baseline Settings to correct it.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none. Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, please modify the baseline: Select the Start Cycle and End Cycle values so that the baseline ends before significant fluorescence is detected.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation is required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the appropriate thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Table A3: Detection fluorescence channels of different Real Time PCR systems.



ANNEX 3

OPTICAL MEASUREMENT EXPOSURE SETTING

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". This assay has been validated with the following set exposition values:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology): FAM channel -500*, HEX channel – 1000, ROX channel – 1000 and Cy5 channel - 1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology): FAM channel - 500, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel - 500.

*If the result in channel FAM is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Sexually Transmitted Diseases* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y/o *Mycoplasma hominis* en muestras urogenitales, endocervicales y de orina procedentes de pacientes con signos y síntomas de enfermedad de transmisión sexual. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de las enfermedades de transmisión sexual en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de las muestras clínicas, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y *Mycoplasma hominis*.

2. Introducción y explicación

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) representan un grupo de enfermedades que afectan la salud sexual y reproductiva de millones de personas, siendo un problema de interés público. Los agentes etiológicos responsables de las ITS incluyen hongos, bacterias, parásitos y virus. Algunos de estos microorganismos son eliminados al cabo de un período de tiempo, mientras que otros son recurrentes y se mantienen en el organismo de forma asintomática, permitiendo el progreso de la enfermedad y generando consecuencias como inflamaciones del tracto genito-urinario, infertilidad e incluso el desarrollo de cáncer.

La infección por *Trichomonas vaginalis* es una de las enfermedades de transmisión sexual (ETS) más comunes en el mundo. *Trichomonas vaginalis* es un protozoo patógeno flagelado perteneciente al orden *Trichomonadida* localizado tanto en el tracto urogenital masculino como femenino, aunque también se ha aislado en el tracto respiratorio de bebés y adultos. En las mujeres se puede encontrar en la vagina y en la uretra, mientras que en los hombres se puede encontrar en la uretra, la próstata y el epidídimo. La infección por *Trichomonas vaginalis* se ha asociado con vaginitis, cervicitis y uretritis, rotura prematura de membranas y parto prematuro en mujeres embarazadas. La infección por *Trichomonas vaginalis* también se ha asociado con un mayor riesgo de adquisición y transmisión del VIH en mujeres.

Entre otros patógenos de transmisión sexual, se pueden encontrar cuatro especies de bacterias del género *Mycoplasma* (*Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* y *Ureaplasma parvum*) cuya presencia también puede dar lugar a diversas infecciones del tracto genitourinario en humanos.

Mycoplasma hominis coloniza el tracto urogenital inferior y se asocia con infecciones urogenitales, particularmente vaginosis bacteriana y uretritis no gonocócica. También está involucrado en infecciones genitales adicionales, como la fiebre posparto o posterior al aborto, en infecciones de heridas posteriores a la cesárea o después de una histerectomía. En los recién nacidos, puede causar meningitis, abscesos cerebrales e infecciones oculares. En adultos, se han descrito bacteriemia, artritis séptica, osteítis, endocarditis, mediastinitis, abscesos cerebrales e infecciones respiratorias. La mayoría de los pacientes tienen factores predisponentes, que



incluyen inmunosupresión, trauma, problemas respiratorios o post-manipulación y/o cirugía del tracto genitourinario. Se considera una bacteria presente en la micro flora normal en el 20% de la población masculina y en el 40% de la población femenina.

Mycoplasma genitalium es un organismo anaeróbico facultativo y una causa reconocida de uretritis no gonocócica en los hombres. En mujeres, *M. genitalium* se ha asociado con cervicitis, endometritis, enfermedad pélvica inflamatoria (PID), infertilidad, susceptibilidad al VIH y resultados adversos en el nacimiento, lo que indica una relación constante con la patología del tracto genital femenino. Las consecuencias reproductivas a largo plazo de la infección por *M. genitalium* en individuos asintomáticos deben investigarse más a fondo.

Las especies de *Ureaplasma* a menudo están presentes en la mucosa genital humana de personas asintomáticas. En humanos, existen dos especies principales, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum* (familia *Mycoplasmataceae*, género *Ureaplasma*), ambos forman parte de la flora genital tanto de hombres como de mujeres y están presentes en casi el 70% de la población sexualmente activa. Estas bacterias causan inflamación y conducen a corioamnionitis, partos prematuros y ruptura prematura de membranas. Recientemente, se han descubierto su comportamiento patogénico en la espermatogénesis y la posterior infertilidad masculina. Aunque los portadores masculinos y femeninos son asintomáticos, *Ureaplasma* spp. en ocasiones puede encontrarse aislado en las lesiones neonatales como la displasia broncopulmonar, la hemorragia intraventricular y la enterocolitis necrosante.

Neisseria gonorrhoeae es un patógeno humano obligado y es el agente etiológico de la gonorrea. Los síntomas incluyen cervicitis en mujeres y uretritis, faringitis y proctitis en ambos sexos. Si no se trata, las mujeres pueden experimentar secuelas graves de enfermedad inflamatoria pélvica, dolor pélvico crónico, embarazo ectópico e infertilidad tubárica, mientras que los hombres pueden desarrollar epididimitis, prostatitis y estenosis uretral.

Chlamydia trachomatis es una pequeña bacteria intracelular que no son capaces de replicarse por sí solas y requiere de células vivas para ello. Existen 18 serotipos; de los cuales los comprendidos entre D-K son los que causan infecciones de transmisión sexual, así como infecciones neonatales. La mayoría de las infecciones genitales por clamidia tanto en hombres como en mujeres son asintomáticas. Cuando se presentan los síntomas, una infección del tracto urogenital inferior puede manifestarse como cervicitis en las mujeres y uretritis en hombres y mujeres. Ya sea sintomática o asintomática, la clamidia no tratada puede ascender al tracto genital superior. En hombres, esto puede causar epididimitis, aunque no se cree que sea una causa importante de secuelas a largo plazo. Sin embargo, en mujeres, la infección del tracto superior puede causar enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), un espectro de trastornos clínicos que involucran infección e inflamación del útero, las trompas de Falopio, los ovarios o el peritoneo adyacente.

Los ensayos de diagnóstico convencionales, carecen de sensibilidad, requieren organismos viables y, por lo tanto, condiciones especiales de envío y, a veces, muestreo invasivo. Sin embargo, las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, como la PCR en tiempo real, nos permiten mejorar algunas de estas limitaciones. Recientemente se han comercializado varios ensayos de diagnóstico molecular para ayudar al diagnóstico sintomático de las ITS. Además, la técnica es capaz de detectar varios patógenos en una sola muestra.



3. Procedimiento

VIASURE *Sexually Transmitted Diseases* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y/o *Mycoplasma hominis* en muestras urogenitales, endocervicales y de orina procedentes de pacientes con signos y síntomas de enfermedad de transmisión sexual. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de las enfermedades de transmisión sexual se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan en una región conservada de los genes *T. vaginalis-specific 2-kb repeated sequence (Trichomonas vaginalis)*, gen *ureasa (Ureaplasma urealyticum y Ureaplasma parvum)*, gen *gidC (Mycoplasma hominis)*, genes *porA y Opa (Neisseria gonorrhoeae)*, una región dentro del ORF2 del plásmido clamidial (*Chlamydia trachomatis*) y gen *MgPa adhesin (Mycoplasma genitalium)*.

VIASURE *Sexually Transmitted Diseases* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Sexually Transmitted Diseases* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Cada kit incluye dos tipos de tiras y cada una de ellas corresponde a un ensayo diferente. La primera tira contiene la mezcla de reacción multiplex para *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma genitalium* (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* & *Mycoplasma genitalium* 4/8-well strips). Tras la reacción de amplificación, *Neisseria gonorrhoeae* se detecta en el canal ROX, *Chlamydia trachomatis* se detecta en el canal FAM, *Mycoplasma genitalium* se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2). La primera tira (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* & *Mycoplasma genitalium* 4/8-well strips) contiene el control interno (CI) que es amplificado y detectado en el canal Cy5. La segunda tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y *Mycoplasma hominis* (*Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* & *Mycoplasma hominis* 4/8-well strips). Tras la reacción de amplificación *Trichomonas vaginalis* se detecta en el canal FAM, *Ureaplasma urealyticum* se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2), *Ureaplasma parvum* se detecta en el canal ROX y *Mycoplasma hominis* se detecta en el canal Cy5.

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Sexually Transmitted Diseases* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1 y 2. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla 1 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos



compatibles para tiras de 8 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 2 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> & <i>Mycoplasma genitalium</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	3/6 tiras de 8 pocillos
<i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Ureaplasma parvum</i> & <i>Mycoplasma hominis</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	3/6 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Sexually Transmitted Diseases</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Sexually Transmitted Diseases* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-STD106L, VS-STD106H, VS-STD112L y VS-STD112H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> & <i>Mycoplasma genitalium</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Transparente	9 tiras de 4 pocillos
<i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Ureaplasma parvum</i> & <i>Mycoplasma hominis</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	9 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Sexually Transmitted Diseases</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	18 tiras de 4 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Sexually Transmitted Diseases* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-STD136. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).



5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Sexually Transmitted Diseases* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

VIASURE *Sexually Transmitted Diseases* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid) y Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.



- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible, Ref VS-STD136). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para VS-STD136 (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas así como para evitar la contaminación.
- Asegurarse de utilizar un pocillo para la determinación de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma genitalium* y otro para la determinación de *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y *Mycoplasma hominis*. Tener cuidado de no mezclarlos durante todo el proceso.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.
- El producto VIASURE *Sexually Transmitted diseases* Real Time PCR Detection kit solamente se ha validado con los equipos mencionados en el Apartado 5 de estas Instrucciones de uso. El resto de los equipos de PCR a tiempo real compatibles indicados en el Anexo 1 se basan en datos bibliográficos.

8. Procedimiento del test

8.1. Preparación de la muestra

Los especímenes clínicos (muestras urogenitales, de orina, rectales y endocervicales) se deben recoger en recipientes limpios y deben ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda el uso de muestras frescas.



Para conservar durante un tiempo prolongado, las muestras pueden congelarse a -20°C . En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. No se recomiendan ciclos de congelación y descongelación. Homogenizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

8.1.1. Extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Para la extracción de DNA a partir de muestras clínicas puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- ZP02006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit, using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).
- US121 NX-48 Urine/Swab DNA Kit utilizando Nextractor® NX-48 (Genolution Inc.).
- MagDEA® Dx SV, utilizando magLEAD® 6gC (Precision System Science)).
- NucleoSpin® RNA Virus (MACHEREY-NAGEL).
- NucleoMag® Pathogen (MACHEREY-NAGEL).
- STARMag 96x4 Universal Cartridge Kit (Seegene, Korea).
- Microlab STAR Let automatic extraction system (Hamilton, Switzerland).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *Sexually Transmitted Diseases* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Sexually Transmitted Diseases* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 μL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.3. Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.



Añadir 15 µL del Rehydration buffer (vial azul) en cada pocillo.

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *Sexually Transmitted Diseases* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) en diferentes pocillos y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla 3. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*Chlamydia trachomatis* y *Trichomonas vaginalis*), HEX, JOE o VIC (*Mycoplasma genitalium* y *Ureaplasma urealyticum*), ROX (*Neisseria gonorrhoeae* y *Ureaplasma parvum*) y Cy5 (Control Interno y *Mycoplasma hominis*). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de enfermedades transmitidas por garrapatas. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

Interpretación de los resultados para *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* & *Mycoplasma genitalium* 4/8-well strips:

- Una muestra se considera positiva para ***Chlamydia trachomatis*** si muestra señal de amplificación en el canal FAM y el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no señal de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.



- Una muestra se considera positiva para ***Neisseria gonorrhoeae*** si muestra señal de amplificación en el canal ROX y el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no señal de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.
- Una muestra se considera positiva para ***Mycoplasma genitalium*** si muestra señal de amplificación en el canal HEX y el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no señal de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.
- Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta.
- El experimento se considera fallido si muestra señal de amplificación en el control negativo y/o no presenta señal de amplificación en el control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.
- En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

Interpretación de los resultados para *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* & *Mycoplasma hominis* 4/8-well strips:

- Una muestra se considera positiva para ***Trichomonas vaginalis*** si muestra señal de amplificación en el canal FAM y el valor Ct obtenido es menor de 40.
- Una muestra se considera positiva para ***Ureaplasma urealyticum*** si muestra señal de amplificación en el canal HEX/VIC/JOE y el valor Ct obtenido es menor de 40.
- Una muestra se considera positiva para ***Ureaplasma parvum*** si muestra señal de amplificación en el canal ROX y el valor Ct obtenido es menor de 40.
- Una muestra se considera positiva para ***Mycoplasma hominis*** si muestra señal de amplificación en el canal Cy5 y el valor Ct obtenido es menor de 40.
- Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral.
- El experimento se considera fallido si muestra señal de amplificación en el control negativo y/o no presenta señal de amplificación en el control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.



Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* & *Mycoplasma genitalium*).

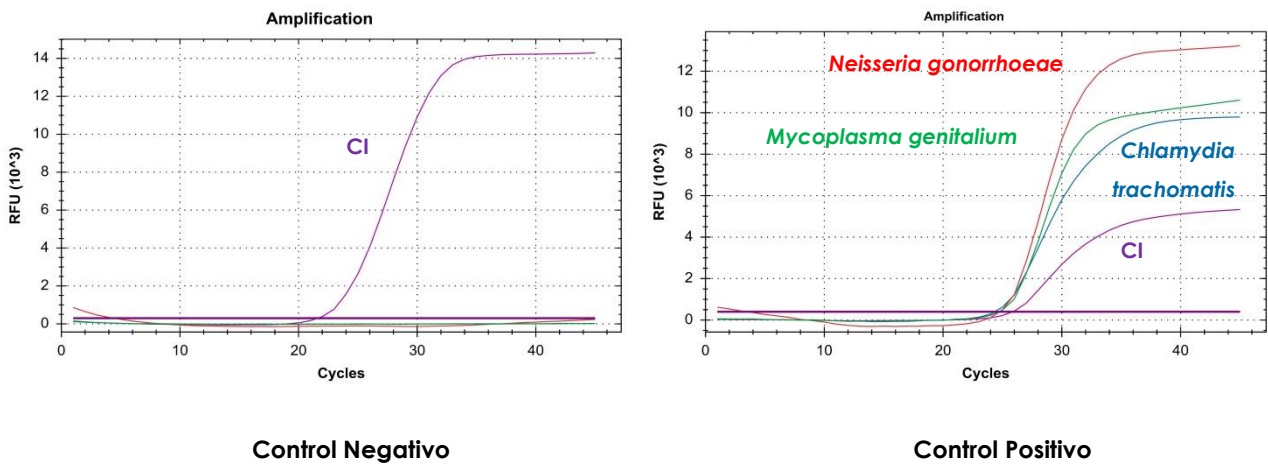
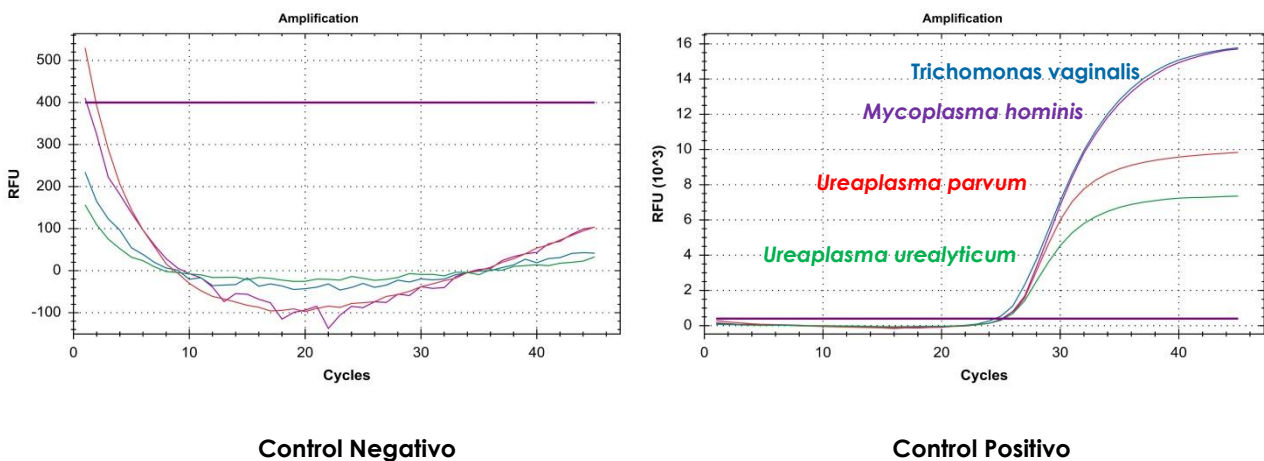


Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* & *Mycoplasma hominis*).



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.



10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de muestras urogenitales y muestras endocervicales, para *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y *Mycoplasma hominis*; muestras rectales (muestras rectales-vaginales y muestras rectales) para *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*; y muestras de orina para *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y *Mycoplasma hominis*.
- El ON 0318 solo interviene en la evaluación de la conformidad del ensayo para *Chlamydia trachomatis*. El alcance de la certificación CE abarca la detección de *Chlamydia trachomatis* a partir de muestras de orina e hisopados urogenitales y endocervicales. La detección de *Chlamydia trachomatis* en muestras faríngeas, de semen, suero e hisopados rectales, uretrales y vaginales quedan fuera del alcance de la certificación por el ON 0318. El resto de los patógenos tienen marcado CE de autocertificación.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico debe ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *Sexually Transmitted Diseases*, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

11. Control de calidad

VIASURE *Sexually Transmitted Diseases* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

Se evaluaron 948 muestras diferentes (orina de primera micción, frotis rectales, frotis uretrales, frotis endocervicales/exudados, frotis vaginales y frotis faríngeos) de pacientes sintomáticos utilizando VIASURE *Sexually Transmitted Diseases* Real Time PCR Detection Kit. De todas las muestras analizadas, se obtuvieron 46 muestras discordantes. Estas discrepancias se observaron principalmente en muestras cercanas al límite de detección.

Los resultados obtenidos se compararon con un método de detección molecular (Allplex™ STI Essential Assay (Seegene)). De las 46 muestras discordantes, 35 fueron confirmadas mediante el uso de otro kit de detección



molecular, FTD Urethritis plus (Fast Track Diagnostics). El resto de las muestras discrepantes no se pudieron volver a analizar por falta de muestra.

Los resultados fueron los siguientes:

VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit	Allplex™ STI Essential Assay (Seegene)			
		+	-	Total
	+	19	1	20
	-	1	927	928
	Total	20	928	948

Table 4. Comparativa de resultados para *Neisseria gonorrhoeae*.

VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit	Allplex™ STI Essential Assay (Seegene)			
		+	-	Total
	+	68	3	71
	-	2	875	877
	Total	70	878	948

Table 5. Comparativa de resultados para *Chlamydia trachomatis*.

VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit	Allplex™ STI Essential Assay (Seegene)			
		+	-	Total
	+	28	1	29
	-	2	917	918
	Total	30	918	948

Table 6. Comparativa de resultados para *Mycoplasma genitalium*.

VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit	Allplex™ STI Essential Assay (Seegene)			
		+	-	Total
	+	20	3	23
	-	0	925	925
	Total	20	928	948

Table 7. Comparativa de resultados para *Trichomonas vaginalis*.



VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit	Allplex™ STI Essential Assay (Seegene)			
		+	-	Total
	+	166	6	172
	-	7	769	776
	Total	173	775	948

Table 8. Comparativa de resultados para *Ureaplasma urealyticum*.

VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit	Allplex™ STI Essential Assay (Seegene)			
		+	-	Total
	+	402	13	415
	-	5	528	533
	Total	407	541	948

Table 9. Comparativa de resultados para *Ureaplasma parvum*.

VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit	Allplex™ STI Essential Assay (Seegene)			
		+	-	Total
	+	183	2	185
	-	0	763	763
	Total	183	765	948

Table 10. Comparativa de resultados para *Mycoplasma hominis*.

Los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN para VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR detection kit (CerTest Biotec) en comparación con Allplex™ STI Essential Assay (Seegene) se muestran en la siguiente tabla:

Microorganismo	SE (%)	SP (%)	VPP (%)	VPN (%)
<i>C. trachomatis</i>	97.14	99.6	95.77	99.77
<i>M. genitalium</i>	93.33	99.89	96.55	99.78
<i>N. gonorrhoeae</i>	95	99.89	95	99.79
<i>T. vaginalis</i>	100	99.68	86.96	100
<i>U. urealyticum</i>	95.95	99.23	96.51	99.1
<i>U. parvum</i>	98.77	97.6	96.87	99.06
<i>M. hominis</i>	100	99.74	98.92	100

Tabla 11. Valores de sensibilidad, especificidad, valores de VPP y VPN para VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit.



Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Sexually Transmitted Diseases*; utilizando VIASURE *Sexually Transmitted Diseases* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *Sexually Transmitted Diseases* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción (Figura 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9).

Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar de *Trichomonas vaginalis* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción multiplex *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* & *Mycoplasma hominis*, canal FAM).

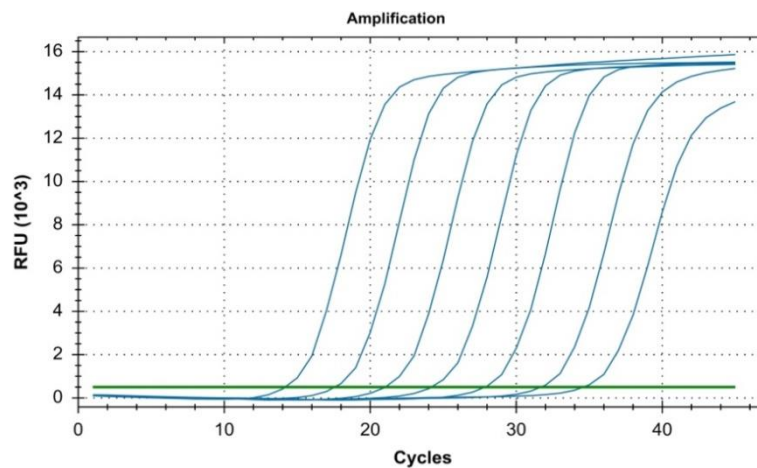


Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar de *Ureaplasma urealyticum*. (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción multiplex *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* & *Mycoplasma hominis*, canal HEX).

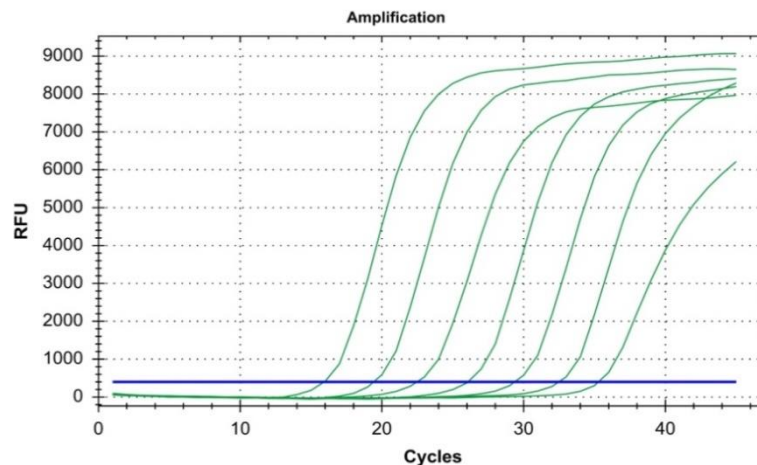


Figura 5. Diluciones seriadas de un estándar de *Ureaplasma parvum* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción multiplex *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* & *Mycoplasma hominis*, canal ROX).

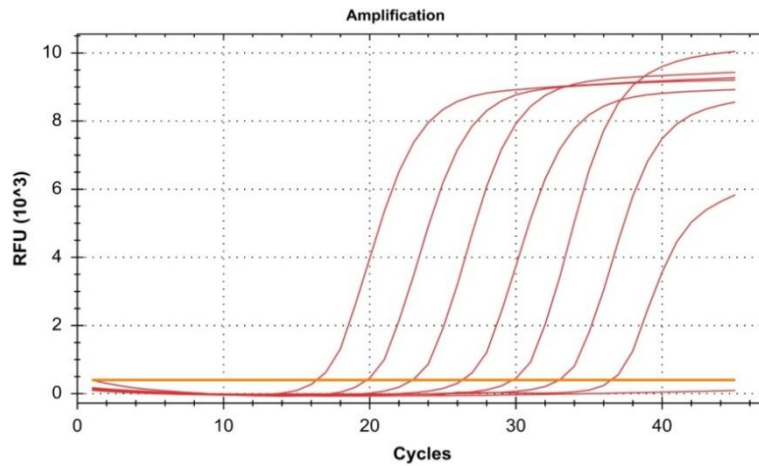


Figura 6. Diluciones seriadas de un estándar de *Mycoplasma hominis*. (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción multiplex *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* & *Mycoplasma hominis*, canal Cy5).

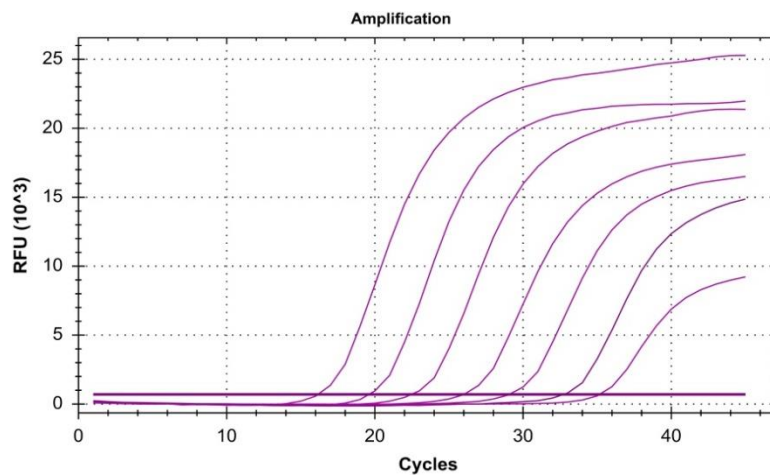


Figura 7. Diluciones seriadas de un estándar de *Chlamydia trachomatis* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción multiplex *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* & *Mycoplasma genitalium*, canal FAM).

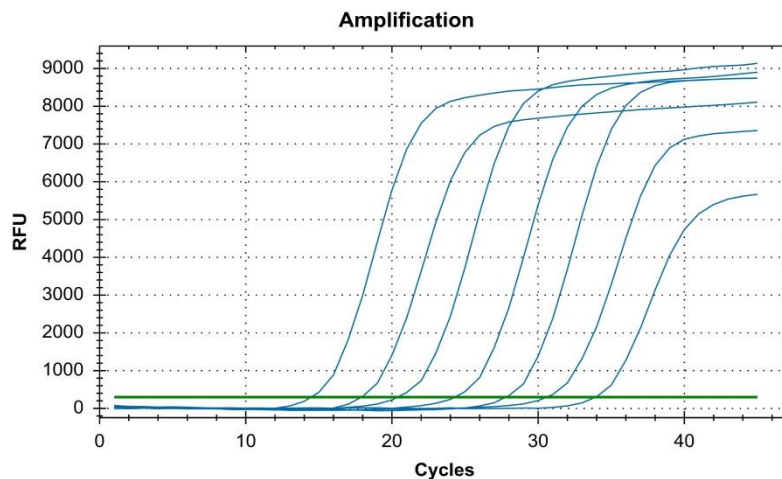


Figura 8. Diluciones seriadas de un estándar de *Mycoplasma genitalium* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción multiplex *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* & *Mycoplasma genitalium*, canal HEX).

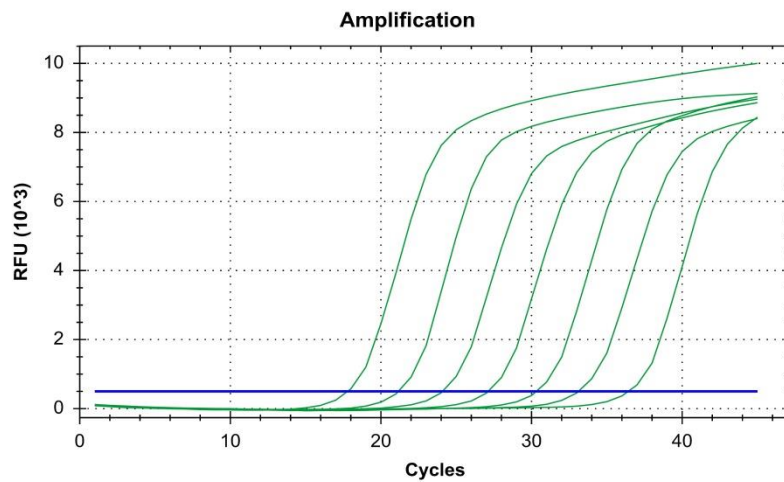
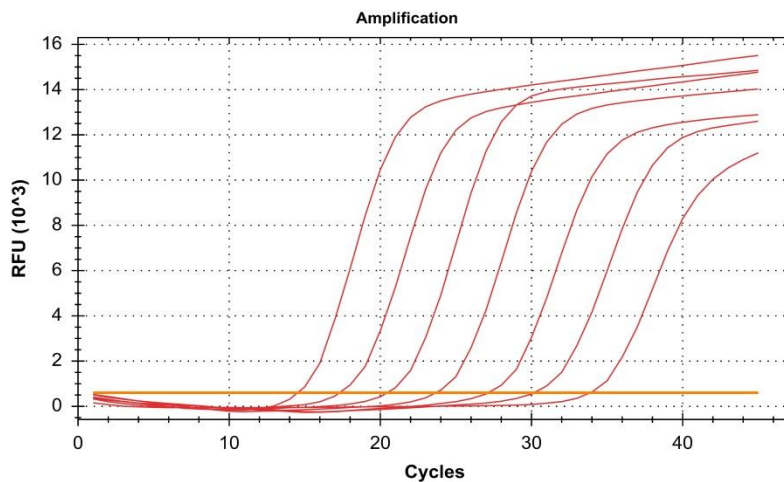


Figura 9. Diluciones seriadas de un estándar de *Neisseria gonorrhoeae* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción multiplex *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* & *Mycoplasma genitalium*, canal ROX).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de enfermedades de transmisión sexual fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos de enfermedades de transmisión sexual más comunes. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados.



Prueba de reacción cruzada					
<i>Candida parapsilosis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	<i>Escherichia coli</i> 0.1285; O18:H7:K1	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus	-
<i>Candida krusei</i>	-	<i>Haemophilus influenza</i> MinnA	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
<i>Candida dubliniensis</i>	-	<i>Haemophilus ducreyi</i> class 1	-	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Listeria ivanovii</i>	-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-/+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Ureaplasma parvum</i>	-/+
<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV)	-/+	<i>Listeria innocua</i>	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-/+
<i>Chlamydia trachomatis</i> (SW)	-/+	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-/+	Cytomegalovirus	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> (Genovar F)	-/+	<i>Mycoplasma hominis</i>	-/+	Virus del Herpes simple 1	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-/+	Virus del Herpes simple 2	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	Papillomavirus humano 16	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-	Papillomavirus humano 18	-

Tabla 12. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit para *Neisseria gonorrhoeae* se evaluó frente a *Neisseria gonorrhoeae* cepa St 49226 y LVI Ng PorA, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit para *Chlamydia trachomatis* se evaluó frente a *Chlamydia trachomatis* (SW and LGV) cepas Swedish, Genovar F, y Serovares D, E, I, K y J, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit para *Mycoplasma genitalium* se evaluó frente a *Mycoplasma genitalium*, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit para *Trichomonas vaginalis* se evaluó frente a *Trichomonas vaginalis*, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit para *Ureaplasma urealyticum* se evaluó frente a *Ureaplasma urealyticum*, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit para *Ureaplasma parvum* se evaluó frente a *Ureaplasma parvum*, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE Sexually Transmitted Diseases Real Time PCR Detection Kit para *Mycoplasma hominis* se evaluó frente a *Mycoplasma hominis*, mostrando un resultado positivo.












13. Bibliography/Bibliografía

1. D. León *et al.* Molecular detection of sexually transmitted agents in a symptomatic group of men and its relationship with sexual behaviour. *Revista Chilena de Infectología* 2016; 33(5):505-512.
2. A. K. Wendel *et al.* Trichomonas vaginalis Polymerase Chain Reaction Compared with Standard Diagnostic. *Clinical Infectious Diseases* 2020; 35:576-80.
3. G. Kusdian *et al.* The biology of Trichomonas vaginalis in the light of urogenital tract infection. *Molecular and Biochemical Parasitology Journal* (2015).
4. T. Posse *et al.* Bacteriemia por Mycoplasma hominis: un agente etiológico subestimado. *Revista Argentina Microbiología*. 2017;02.009.
5. F. Kazumasa *et al.* Rapid and simple detection of Ureaplasma species from vaginal swab samples using a loop-mediated isothermal amplification method. *American Journal of Reproductive Immunology* 2017;e12771.
6. S. Ona *et al.* Mycoplasma genitalium: An Overlooked Sexually Transmitted Pathogen in Women? *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 2016; 2016: 4513089.
7. N. Lai-King *et al.* The laboratory diagnosis of Neisseria gonorrhoeae. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2005 Jan-Feb; 16(1): 15–25.
8. CDC Grand Rounds: Chlamydia prevention: challenges and strategies for reducing disease burden and sequelae. *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*.
9. G. Fernández *et al.* Usefulness of a novel multiplex real-time PCR assay for the diagnosis of sexually-transmitted infections. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2016.
10. S. Alexander *et al.* Evaluation of strategies for confirming Neisseria gonorrhoeae nucleic acid amplification tests. *Journal of Medical Microbiology* 2011; 60: 909-912.
11. J. Schirm *et al.* Trichomonas vaginalis detection using real-time TaqMan PCR. *Journal of Microbiological Methods* 2007; 68(2): 243-247.
12. J. Yi *et al.* Detection and biovar discrimination of Ureaplasma urealyticum by real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes* 2005; 19(4): 255-260.
13. J.S. Jensen *et al.* Use of TaqMan 5' nuclease real-time PCR for quantitative detection of Mycoplasma genitalium DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually transmitted disease clinic. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(2): 683-692.
14. T.A. Halse *et al.* A multiplexed real-time PCR assay for rapid detection of Chlamydia trachomatis and identification of serovar L-2, the major cause of Lymphogranuloma venereum in New York. *Molecular and Cellular Probes* 2006 Oct;20(5):290-7. Epub 2006 Mar 6.
15. D. Férandon *et al.* Development of a real-time PCR targeting the yidC gene for the detection of Mycoplasma hominis and comparison with quantitative culture. *Clinical Microbiology and Infection* 2011; 17(2): 155-159.



14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

	<p><i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i></p>		<p>Keep dry Almacenar en lugar seco</p>		<p>Use by Fecha de caducidad</p>		<p>Manufacturer Fabricante</p>		<p>Batch code Número de lote</p>
	<p>Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso</p>		<p>Temperature limitation Limitación de temperatura</p>		<p>Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test</p>	DIL	<p>Sample diluent Diluyente de muestra</p>		<p>Catalogue number Número de referencia</p>



ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	Optical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".

(2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.

(3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.

(4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.

(5) No lectura en canal Cy5.

(6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.



ANEXO 2

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo de la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquaring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real



ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.

- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 - 500.

*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Revision: September 2019





CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC

*El Organismo Notificado 0318 solo interviene en la identificación de *Chlamydia trachomatis* incluida en NMT/
The Notified Body 0318 is only involved in the identification of *Chlamydia trachomatis* included in NMT.