

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



N. gonorrhoeae + C. trachomatis

CE 0318* IVD

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

These instructions for use apply to the following references / Estas instrucciones de uso aplican para las siguientes referencias:

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 1) / FORMATO OPEN Y ROTOR-GENE CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 1)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-CTN106L
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-CTN106H
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-CTN112L
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-CTN112H
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-CTN113L
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-CTN113H
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CTN136
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CTN172
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-CTN101L
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-CTN101H
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CTN101

Table A 1. References for Open and Rotor-Gene format with internal control products. / Referencias para productos Open and Rotor-Gene Format con control interno.

TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 2) / FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 2)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-CTN196T

Table A 2. References for Tube format with internal control products. / Referencias para productos formato Tubo con control interno.

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL (SEE ANNEX 3) / OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL DE EXTRACCIÓN (VER ANEXO 3)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-CTN106LE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-CTN106HE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-CTN112LE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-CTN112HE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-CTN113LE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-CTN113HE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CTN136E
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CTN172E
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-CTN101HE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-CTN101LE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CTN101E

Table A 3. References for Open and Rotor-Gene format with extraction control products. / Referencias para productos Open and Rotor-Gene Format con control de extracción.

TUBE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL (SEE ANNEX 4) / FORMATO TUBO CON CONTROL DE EXTRACCIÓN (VER ANEXO 4)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-CTN196TE

Table A 4. References for Tube format with extraction control products. / Referencias para productos formato Tubo con control de extracción.

Content

1.	Intended use	7
2.	Summary and Explanation	7
3.	Principle of the procedure	8
4.	Reagents provided	8
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	8
6.	Transport and storage conditions	9
7.	Precautions for users	9
8.	Test procedure	11
8.1.	Specimen collection, transport and storage	11
8.2.	DNA extraction	12
9.	Result interpretation	12
9.1.	References with internal control (references in Annex 1 and 2)	12
9.2.	References with extraction control (references in Annex 3 and 4)	14
10.	Limitations of the test	16
11.	Quality control	17
12.	Performance characteristics	17
12.1.	Clinical sensitivity and specificity	17
12.2.	Analytical sensitivity	18
12.3.	Analytical specificity	19
12.4.	Analytical reactivity	20
	ANNEX 1	21
A1.1	Principle of the procedure	21
A1.2	Reagents provided	21
A1.3	Test procedure	22
A1.3.1	Lyophilized positive control	22
A1.3.2	PCR protocol	23
	ANNEX 2	24
A2.1	Principle of the procedure	24
A2.2	Reagents provided	24
A2.3	Test procedure	24
A2.3.1	Lyophilized positive control	24
A2.3.2	Lyophilized reaction mix tube	25
A2.3.3	PCR protocol	25
	ANNEX 3	27
A3.1	Principle of the procedure	27
A3.2	Reagents provided	27
A3.3	Test procedure	29
A3.3.1	Lyophilized extraction control	29
A3.3.2	Lyophilized positive control	29
A3.3.3	PCR protocol	29
	ANNEX 4	31
A4.1	Principle of the procedure	31

A4.2 Reagents provided	31
A4.3 Test procedure	32
A4.3.1 Lyophilized extraction control	32
A4.3.2 Lyophilized positive control.....	32
A4.3.3 Lyophilized reaction mix tube.....	32
A4.3.4 PCR protocol	33

Contenido

1. Uso previsto	34
2. Introducción y explicación	34
3. Procedimiento	35
4. Reactivos suministrados	35
5. Material requerido y no suministrado	35
6. Condiciones de transporte y almacenamiento	36
7. Precauciones para el usuario	37
8. Procedimiento del test.....	38
8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras.....	38
8.2. Extracción de DNA.....	39
9. Interpretación de resultados.....	39
9.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)	39
9.2. Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexos 3 y 4)	41
10. Limitaciones del test.....	43
11. Control de calidad.....	44
12. Características del test	44
12.1. Sensibilidad y especificidad clínica	44
12.2. Sensibilidad analítica	46
12.3. Especificidad analítica	47
12.4. Reactividad analítica	47
ANEXO 1	48
A1.1 Procedimiento.....	48
A1.2 Reactivos suministrados	48
A1.3 Procedimiento del test	50
A1.3.1 Control positivo liofilizado	50
A1.3.2 Protocolo PCR	50
ANEXO 2	51
A2.1 Procedimiento.....	51
A2.2 Reactivos suministrados	51
A2.3 Procedimiento del test	51
A2.3.1 Control positivo liofilizado	51
A2.3.2 Mezcla de reacción liofilizada	52
A2.3.3 Protocolo PCR	52
ANEXO 3	54
A3.1 Procedimiento.....	54
A3.2 Reactivos suministrados	54
A3.3 Procedimiento del test	56

A3.3.1 Control de extracción liofilizado	56
A3.3.2 Control positivo liofilizado	56
A3.3.3 Protocolo PCR	56
ANEXO 4	58
A4.1 Procedimiento.....	58
A4.2 Reactivos suministrados	58
A4.3 Procedimiento del test	59
A4.3.1 Control de extracción liofilizado	59
A4.3.2 Control positivo liofilizado	59
A4.3.3 Mezcla de reacción liofilizada	59
A4.3.4 Protocolo PCR	59
Bibliography/Bibliografía	61
Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i>	61
Trademarks.....	61

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit is a real time PCR assay designed for the simultaneous qualitative detection and identification of DNA from *N. gonorrhoeae* and/or *C. trachomatis*, from urethral urine, urethral swabs, rectal swabs, endocervical swab/exudate, vaginal and oropharyngeal swabs samples of individuals suspected of gonorrhoea and/or chlamydia diseases, by their healthcare professional (HCP). This test is intended for use as an aid in the diagnosis of *N. gonorrhoeae* and/or *C. trachomatis* infection, in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from clinical specimens, amplified using real time PCR, and detected using fluorescent reporter dye probes specific for *N. gonorrhoeae* and/or *C. trachomatis*.

2. Summary and Explanation

Sexually transmitted infections (STIs) are a major public health problem worldwide, affecting quality of life and causing serious morbidity and mortality. In particular, gonorrhoea and chlamydia are two conditions which represent the most common bacterial STI.

N. gonorrhoeae is a bacterium (gonococcus) mainly known worldwide as the aetiological agent of gonorrhoea. *N. gonorrhoeae* generally causes mucosal infections of the urogenital tract, predominantly infecting columnar and transitional epithelia, although it can also attach to the stratified squamous epithelium of the ectocervix. Such *N. gonorrhoeae* infections most frequently result in urethritis in men and cervicitis in women, but urethritis in women can also be observed. Most of males with gonococcal urethritis are symptomatic, but substantially fewer women with urogenital gonorrhoea are symptomatic and, when present, symptoms are nonspecific. If infections are not detected and/or adequately treated, ascending infections, such as epididymitis and salpingitis, can result in a variety of serious complications and sequelae, particularly in women who bear the major burden of the disease; these complications and sequelae include pelvic inflammatory disease (PID), chronic pelvic pain, ectopic pregnancy, and infertility.

C. trachomatis is a gram-negative bacterium, part of the *chlamydomphila* genus, responsible for the sexually transmitted infectious (STI) disease called Chlamydia. In the USA, it is the most reported bacterial infection, and globally, it is the most common STI. The three biovars of *C. trachomatis*, each consisting of several serovars or genotypes, cause genital infections, lymphogranuloma venereum (LGV: a genital ulcer disease (GUD) that affects lymphoid tissue) and an ocular infection called "trachoma", which is the leading infectious cause of blindness worldwide. Infection in women can manifest as cervicitis, urethritis, pelvic inflammatory disease, perihepatitis, or proctitis, while in men, infection can lead to urethritis, epididymitis, prostatitis, proctitis or reactive arthritis.

Clinical manifestations of chlamydia and gonorrhoea are variable and unspecific, so it makes necessary the identification of the pathogen responsible for the presenting symptomatology. Diagnosis of *N. gonorrhoeae* can be performed with microbiological cultures, which are specific and cheap, with a reasonable sensitivity of 85-95% for urethral and endocervical infection. Gram-stained smears can provide a presumptive diagnosis of gonorrhoea, especially among symptomatic men with urethritis. However, only 50-70% of asymptomatic infections in men are positive on gram-stain.

Although *C. trachomatis* can be diagnosed by culture, direct immunofluorescence assays (DFAs), and laboratory-based and point-of-care enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), nucleic acid amplification tests (NAATs) are strongly recommended due to superior performance characteristics.

Nucleic acid amplification tests (NAATs) are highly sensitive and specific diagnostic tests that can be conducted on a wide range of samples, and have a sensitivity of over 90%, which is higher than for culture (>85%).

3. Principle of the procedure

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit is designed for the qualitative detection and identification of DNA from *N. gonorrhoeae* and/or *C. trachomatis*, from urethral urine, urethral swabs, rectal swabs, endocervical swab/exudate, vaginal and oropharyngeal swabs samples. After DNA isolation, the identification of *N. gonorrhoeae* and/or *C. trachomatis* is performed by the amplification of a conserved region of the ORF2 gene (*C. trachomatis*) and *porA* and *opa* genes (*N. gonorrhoeae*), using specific primers and a fluorescent-labelled probes.

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* 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 *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to verify the correct functioning of the amplification mix.

4. Reagents provided

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit includes the materials and reagents detailed in Annex 1 for open and rotor-gene format with internal control products, Annex 2 for tube format with internal control products, Annex 3 for open and rotor-gene format with extraction control products, and Annex 4 for tube format with extraction control products.

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 *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- Real Time PCR compatible plastic consumables (i.e. individual tubes, well-strips and/or microplates). Only for Tubes format (Annex 2 and 4).
- DNA extraction kit.
- Collection and transport system.
- Laboratory freezers: - 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C.
- 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). Only for Rotor Gene format (Annex 1 and 3).

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit has been tested on the following equipments: 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems), CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), StepOne™ Real Time PCR System (Applied Biosystems), AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies), DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology), DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology), Rotor-Gene® Q (Qiagen), Cobas z480 Analyzer (Roche Diagnostics) and VIASURE V-Lab96 Cycler (CerTest Biotec S.L.). To check thermocycler compatibility and most common detection channels consult website www.certest.es.

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.

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. It is recommended 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 light.
- For Tube format kits: Once the *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Reaction-Mix tube has been reconstituted, it may be kept it at 25°C±5°C or 2°C to 8°C for up to 4 hours. For a longer period of time, it is recommended store at -20°C and to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles (up to 6 times).

7. Precautions for users

- The product is intended for use by qualified and trained clinical laboratory personnel specifically instructed and trained in the techniques of real-time PCR and *in vitro* diagnostic procedures (including training on the Real Time PCR instrument (thermocycler) and Nucleic acid extraction system).
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.

- 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 (for references: VS-CTN113L, VS-CTN113H, VS-CTN136, VS-CTN172, VS-CTN113LE, VS-CTN113HE, VS-CTN136E and VS-CTN172E). Remove any air excess in the pouches prior to closing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- For references VS-CTN101, VS-CTN136, VS-CTN172, VS-CTN101E, VS-CTN136E and VS-CTN172E (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.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or colour different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- 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. Use separate areas for the preparation of patient samples and controls to prevent false positive results.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit and any additional reagents or equipments required for testing are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Specimens must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, 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, transport, storage, handling, and disposal of samples.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment, because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP), or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.

- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Test procedure

Please see Annex 1 for open and rotor-gene format with internal control products Test Procedure, Annex 2 for Tube format with internal control products Test Procedure, Annex 3 for open and rotor-gene format with extraction control products Test Procedure and Annex 4 for Tube format with extraction control products Test Procedure.

8.1. Specimen collection, transport and storage

The VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit has been tested in urethral urine collected in sterile tubes (VACUETTE, Greiner bio-one), urethral swabs, rectal swabs, endocervical swab/exudate, vaginal and oropharyngeal swabs. Swabs samples were collected in sterile single use Copan Liquid Amies Elution Swab (ESwab™) with flocked nylon filled with 1 mL of Liquid Amies preservation medium (COPAN innovation). Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, all specimens should be collected and labelled appropriately in clean containers. After collection, specimens should be placed in a biohazard bag and should be transported and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The urine specimens and endocervical exudates should be transported at Room Temperature (RT) for up to 1 hour, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 1 hour), it is recommend shipping at -20°C or lower. Samples in ESwab® Collection and Preservation System should be transport at 20-25° C for up to 5 days, or at 4° C for up to 7 days, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 7 days), we recommend shipping at -20°C or lower **if preservation medium permits**. We recommend following appropriate laboratory guidelines and/or manufacturer's recommendations for proper preservation of samples in the selected collection and transport medium. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

The clinical specimens must be collected, transported and stored according to appropriate laboratory guidelines. For details, refer to the IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94), and García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

8.2. DNA extraction

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

Due to VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit is also available with extraction control (references include in Annexes 3 and 4), if the Extraction Control (EC) is used to monitor nucleic acid isolation and as PCR inhibition control, add 5µl of the reconstituted EC to the specimen and/or lysis buffer mixture (clinical specimen, as well as positive control and/or negative control). Close each tube and vortex for 10 seconds. If the Extraction Control is used only as a PCR inhibition control, 1µl of the reconstituted EC should be added to the reconstituted Reaction-Mix.

For DNA extraction from clinical samples, you can use your manual or automatic routine optimized system, or any commercially available DNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions. The following extraction kits have been validated:

- MagDEA Dx SV Kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).
- StarMag 96x4 Universal Cartridge (Seegene), using the Microlab STAR Let automatic extraction system (Hamilton).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

9. Result interpretation

9.1. References with internal control (references in Annex 1 and 2)

All the results of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests. Check Internal Control (IC) signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the controls and samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.

It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end-user. Use the Positive Control amplification curve as a starting point during the run validation (before than interpretation of patient sample results), in order to ensure that thresholds fall within the exponential phase of the fluorescence curves and above any background signal. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

The use of positive and negative controls in each run validates the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis* in the positive control well.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Controls	<i>C. trachomatis</i> (FAM) ¹	<i>N. gonorrhoeae</i> (ROX) ¹	Internal Control (HEX) ²	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	≤40	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	> 40 or no signal	> 40 or no signal	≤40	Valid

Table 1. Expected Performance of Controls. Ct values no signal = no amplification curve.

1. In cases where either or both control assays have failed (an amplification signal is observed in the negative control and/or signals absence in the positive control well for any target channel), all results are reported as 'Invalid', and retesting is required.

2. The Internal Control (IC) should show an amplification signal (Ct ≤40) in PC and NC control wells.

Assessment of clinical samples test results should be performed after the positive and negative controls have been examined and determined to be valid and acceptable. If one or more controls are not valid, the patient results cannot be interpreted.

For interpretation of individual patient sample results, use the following table, read and analyze the results:

<i>C. trachomatis</i> (FAM)	<i>N. gonorrhoeae</i> (ROX)	Internal Control (HEX)	Interpretation for patients' individual samples	
≤40	> 40 or no signal	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>C. trachomatis</i> DNA Detected
> 40 or no signal	≤40	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>N. gonorrhoeae</i> DNA Detected
≤40	≤40	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>C. trachomatis</i> and <i>N. gonorrhoeae</i> DNA Detected
> 40 or no signal	> 40 or no signal	≤35 ²	Valid	Targets not Detected
> 40 or no signal	> 40 or no signal	> 35 or no signal ²	Invalid	Test Failure – Repeat Testing ²

Table 2. Interpretation of individual patient sample results. Ct values no signal = no amplification curve.

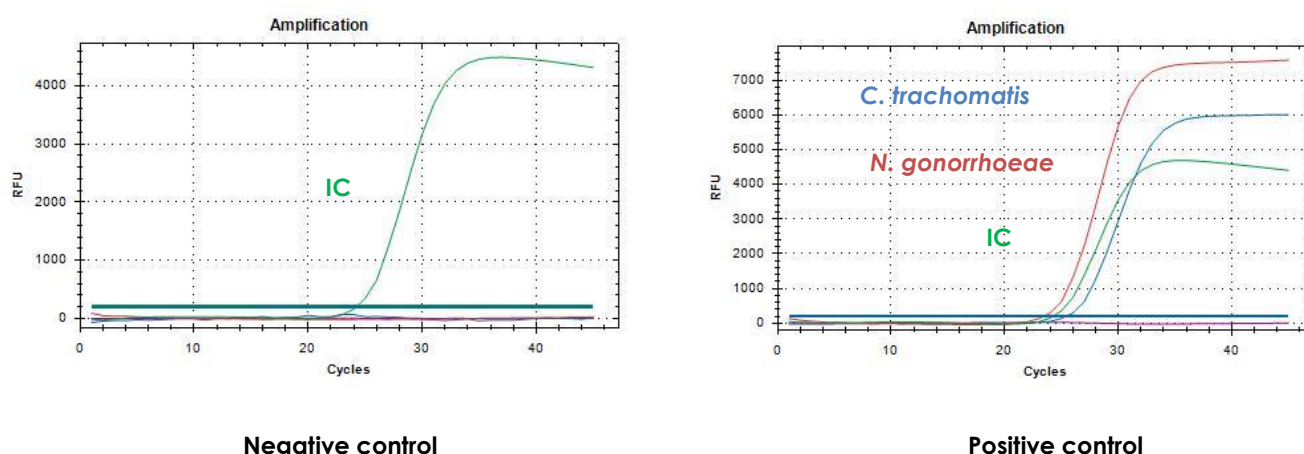
¹ The Internal Control (IC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal). Sometimes, its detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

² In the case of *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis* target genes negative, IC must show an amplification signal with Ct ≤ 35. If there is an absence of signal or Ct value > 35 of the Internal Control, the result is considered as 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition issues.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use, the extraction process used by the user, to verify the correct performance of each qPCR steps and review the parameters, and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. Depending on the available material:

- repeat qPCR with the same isolated DNA sample, or
- re-extract and retest another aliquot of the same specimen or,
- obtain a new specimen and retest.

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).



9.2. References with extraction control (references in Annex 3 and 4)

All the results of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests. Check Extraction Control (EC) signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the controls and samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.

It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end-user. Use the Positive Control amplification curve as a starting point during the run validation (before than interpretation of patient sample results), in order to ensure that thresholds fall within the exponential phase of the fluorescence curves and above any background signal. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

The use of positive and negative controls in each run validates the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis* in the positive control well.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Controls	<i>C. trachomatis</i> (FAM) ¹	<i>N. gonorrhoeae</i> (ROX) ¹	Extraction Control (HEX) ²	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	≤40	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	> 40 or no signal	> 40 or no signal	≤40	Valid

Table 3. Expected Performance of Controls. Ct values no signal = no amplification curve.

1 In cases where either or both of the control assays have failed (an amplification signal is observed in the negative control and/or signals absence in the positive control well for any target channel), all results are reported as 'Invalid', and retesting is required.

2. The Extraction Control (EC) should show an amplification signal (Ct ≤40) in PC and NC control wells.

Assessment of clinical samples test results should be performed after the positive and negative controls have been examined and determined to be valid and acceptable. If one or more controls are not valid, the patient results cannot be interpreted.

For interpretation of individual patient sample results, use the following table, read and analyze the results:

<i>C. trachomatis</i> (FAM)	<i>N. gonorrhoeae</i> (ROX)	Extraction Control (HEX)	Interpretation for patients' individual samples	
≤40	> 40 or no signal	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>C. trachomatis</i> DNA Detected
> 40 or no signal	≤40	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>N. gonorrhoeae</i> DNA Detected
≤40	≤40	≤40 or no signal ¹	Valid	<i>C. trachomatis</i> and <i>N. gonorrhoeae</i> DNA Detected
> 40 or no signal	> 40 or no signal	≤35 ²	Valid	Targets not Detected
> 40 or no signal	> 40 or no signal	> 35 or no signal ²	Invalid	Test Failure – Repeat Testing ²

Table 4. Interpretation of individual patient sample results. Ct values. no signal = no amplification curve.

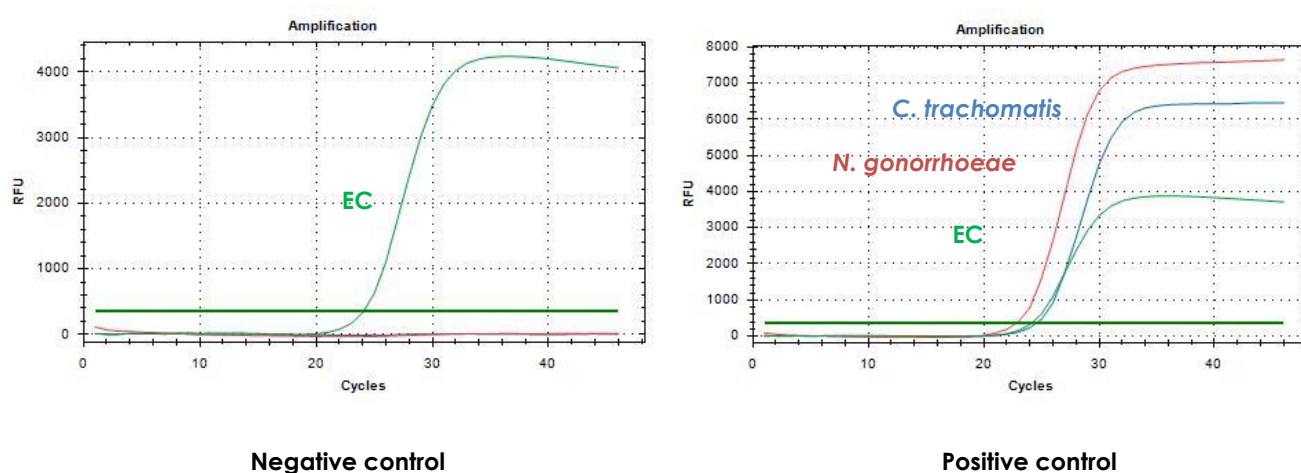
1 The Extraction Control (EC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal). Sometimes, its detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids. Differences can be observed in the values of Ct in the extraction control between the controls and the clinical samples, due to the extraction process.

2 In the case of *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis* target genes negative, EC must show an amplification signal with Ct ≤ 35. If there is an absence of signal or Ct value > 35 of the Extraction Control, the result is considered as 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition issues.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use, the extraction process used by the user, to verify the correct performance of each qPCR steps and review the parameters, and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. Depending on the available material:

- repeat qPCR with the same isolated DNA sample, or
- re-extract and retest another aliquot of the same specimen or,
- obtain a new specimen and retest.

Figure 2. Correct run of negative and positive control run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).



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 urethral urine, urethral swabs, rectal swabs, endocervical swab/exudate, vaginal and oropharyngeal swabs samples.
- ON 0318 only intervenes in the conformity assessment of *Chlamydia trachomatis*. The scope of the CE certification covers the detection of *Chlamydia trachomatis* in urethral urine, urethral swabs, rectal swabs, endocervical swab/exudate, vaginal and oropharyngeal swabs samples. The rest of the pathogens have self-certification for CE marking.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; nucleic acid must be properly extracted from clinical samples.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- 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 *N. gonorrhoeae* and/or *C. trachomatis*, either by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination between Extraction Control and *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control, which contains high copies template, during their reconstitution by adding of Water RNase/DNase free (white vial). Each procedure must take place in established order and in a separate laboratory areas.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including DNA extraction).
 - Degradation of the DNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of *N. gonorrhoeae* and/or *C. trachomatis*.
 - A bacterial load in the specimen below the limit of detection for the assay.
 - The presence of qPCR inhibitors or other types of interfering substances. The impacts of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics, or immunosuppressant drugs, used to prevent *N. gonorrhoeae* and/or *C. trachomatis* infections or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
 - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable bacteria and does not imply that these bacteria are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of *N. gonorrhoeae* and/or *C. trachomatis* target sequences.
- Negative results do not preclude *N. gonorrhoeae* and/or *C. trachomatis* infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions. Optimum specimen types and timing for peak bacterial levels during infections caused by *N. gonorrhoeae* and/or *C. trachomatis* have

not been determined. The collection of multiple specimens (types and time points) from the same patient may be necessary to detect the bacteria.

- If diagnostic tests for other Sexually Transmitted Diseases (STD) are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that *N. gonorrhoeae* and/or *C. trachomatis* infection is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as: PCR equipment, extraction system, type of sample, previous treatment of the sample, etc... among others.

11. Quality control

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* 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) or the Extraction control (EC) in each well confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit was tested using urogenital samples (urethral urine, urethral swabs, rectal swabs, endocervical swab/exudate, vaginal and oropharyngeal swabs). In order to determine the clinical diagnostic accuracy, an evaluation has been conducted through collaboration with national entities. A summary of the sites, sample type and workflow is included in the following table:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	'Servicio de Microbiología y Parasitología' of 'Hospital Universitario Miguel Servet' (Zaragoza, Spain)	urethral urine	StarMag 96x4 Universal Cartridge (Seegene) into the Microlab STAR Let automatic extraction system (Hamilton) + DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	<i>N. gonorrhoeae</i>
		urethral swabs		
		rectal swabs		
		endocervical swab/exudate		<i>C. trachomatis</i>
		vaginal swabs		
		Oropharyngeal swabs		

Table 5. Site, sample type, workflow and target.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV, NPV values for VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following table:

Site	Comparator assay	Target	Sample type	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
1	Allplex™ STI Essential Assay (Seegene)	<i>C. trachomatis</i>	All types	301	597	0	1	0.99 (0.98-1)	1 (0.99-1)	1 (0.98-1)	0.99 (0.98-0.99)
			urethral urine	15	60	0	0	1 (0.78-1)	1 (0.94-1)	1 (0.78-1)	1 (0.94-1)
			urethral swabs	78	152	0	0	1 (0.95-1)	1 (0.97-1)	1 (0.95-1)	1 (0.97-1)
			rectal swabs	13	59	0	1	0.92 (0.66-0.99)	1 (0.93-1)	1 (0.71-1)	0.98 (0.89-0.99)
			endocervical swab/exudate	143	150	0	0	1 (0.97-1)	1 (0.97-1)	1 (0.97-1)	1 (0.97-1)
			vaginal swabs	46	57	0	0	1 (0.92-1)	1 (0.93-1)	1 (0.92-1)	1 (0.93-1)
			oropharyngeal swabs	6	119	0	0	1 (0.54-1)	1 (0.96-1)	1 (0.54-1)	1 (0.96-1)
		<i>N. gonorrhoeae</i>	All types	176	723	0	0	1 (0.97-1)	1 (0.99-1)	1 (0.97-1)	1 (0.99-1)
			urethral urine	12	63	0	0	1 (0.73-1)	1 (0.75-1)	1 (0.73-1)	1 (0.75-1)
			urethral swabs	86	144	0	0	1 (0.95-1)	1 (0.97-1)	1 (0.95-1)	1 (0.97-1)
			rectal swabs	11	62	0	0	1 (0.71-1)	1 (0.94-1)	1 (0.71-1)	1 (0.94-1)
			endocervical swab/exudate	33	260	0	0	1 (0.89-1)	1 (0.98-1)	1 (0.89-1)	1 (0.98-1)
			vaginal swabs	9	94	0	0	1 (0.66-1)	1 (0.96-1)	1 (0.66-1)	1 (0.96-1)
			oropharyngeal swabs	25	100	0	0	1 (0.86-1)	1 (0.96-1)	1 (0.86-1)	1 (0.96-1)

Table 6. True positive (TP) and true negative values (TN), false positive (FP) and false negative (FN) values, sensitivity, specificity, Predictive Positive Values (PPV) and Predictive Negative Values (NPV) for VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit.

Results show high agreement to detect *N. gonorrhoeae* and/or *C. trachomatis* using VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of 5 DNA copies per reaction for *C. trachomatis* and for *N. gonorrhoeae*, with a positive rate of $\geq 95\%$, on vaginal swab clinical samples.

Figure 3. Dilution series of *C. trachomatis* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel FAM).

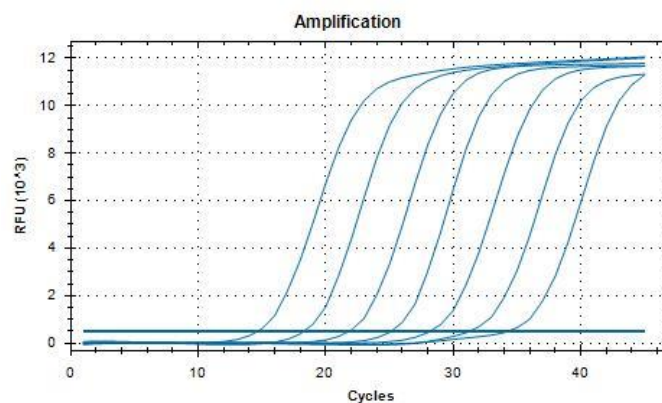


Figure 4. Dilution series of *N. gonorrhoeae* (*porA* gene) (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel ROX).

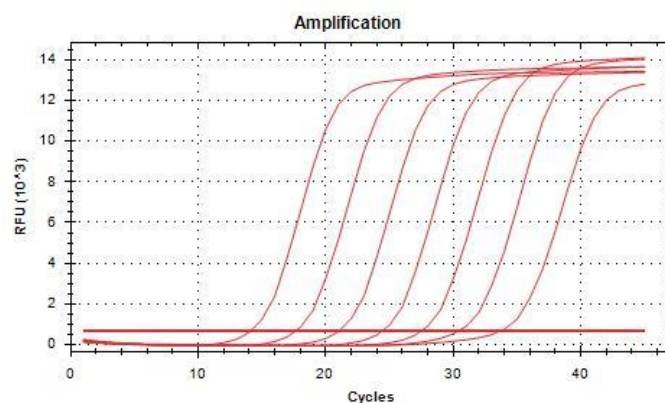
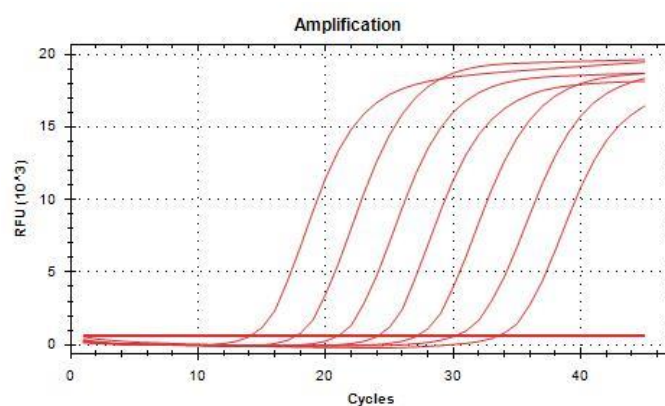


Figure 5. Dilution series of *N. gonorrhoeae* (*opa* gene) (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (channel ROX).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit assay was confirmed by testing a panel of different microorganisms associated to sexually transmitted diseases. No cross-reactivity of the VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit with any of the following microorganisms tested was observed.

Cross-reactivity testing (wet testing)					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Escherichia coli</i> strain 0.1285; O18:H7:K1	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Haemophilus ducreyi</i> strain Class 1	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> strain Minn A	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Candida dubliniensis</i>	-	Hepatitis A virus	-	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	Herpes Simplex Virus 1 strain Macintyre	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Candida krusei</i> (<i>Issatchenkia orientalis</i>)	-	Herpes Simplex Virus 2 strain MS	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	Human Papillomavirus types 16 and 18	-	<i>Streptococcus agalactiae</i> strain 2019	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain 2022	-
Cytomegalovirus strain AD-169	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> serotype Capsular 2	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> serotype Cloaca B	-	<i>Listeria innocua</i> serotype 6a	-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-
<i>Enterobacter cloacae</i> serotype Cloaca A	-	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> serovar 5	-	<i>Ureaplasma parvum</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 4b	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
<i>Enterococcus faecium</i> serotype 11	-	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-		

Table 7. Reference pathogenic microorganisms used in this study performed at CerTest facility.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit for *C. trachomatis* was evaluated against DNA extracted from *Chlamydia trachomatis* strain Swedish; *Chlamydia trachomatis* serovar D, E, F, I, J, K and *Chlamydia trachomatis* strain LGV (as templates), showing positive results.

The reactivity of VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit for *N. gonorrhoeae* was evaluated against DNA extracted from *Neisseria gonorrhoeae* strain 49226; *Neisseria gonorrhoeae* strain Lvl Ng PorA; and *Neisseria gonorrhoeae* strain NCTC 8375 [B 5025] (as templates), showing positive results.

ANNEX 1

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCES
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-CTN106L
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-CTN106H
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-CTN112L
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-CTN112H
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-CTN113L
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-CTN113H
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CTN136
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CTN172
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-CTN101L
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-CTN101H
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CTN101

Table A1 1. References

A1.1 Principle of the procedure

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to discard the inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
<i>C. trachomatis</i>	FAM	ORF2 gene
<i>N. gonorrhoeae</i>	ROX	<i>porA</i> and <i>opa</i> genes
Internal Control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A1 2. Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult the website www.cerTEST.es.

A1.2 Reagents provided

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables A1.3, A1.4 and A1.5. 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 A1.3 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices. Table A1.4 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible devices. Table A1.5 includes materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips. (Consult the thermocycler compatibility on CerTest's website www.cerTEST.es).

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	White	1/6/12 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> 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	1/6/12 x 8-cap strip

Table A1 3. Reagents and materials provided in VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CTN101L, VS-CTN101H, VS-CTN106L, VS-CTN106H, VS-CTN112L and VS-CTN112H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	White	1 plate
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> 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 plate during thermal cycling	Transparent	12 x 8-cap strip

Table A1 4. Reagents and materials provided in VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-CTN113L and VS-CTN113H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	Transparent	2/9/18 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> 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	Caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	2/9/18 x 4-cap strip

Table A1 5. Reagents and materials provided in VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CTN101, VS-CTN136 and VS-CTN172. 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).

A1.3 Test procedure

A1.3.1 Lyophilized positive control

N. gonorrhoeae + *C. trachomatis* 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 *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control (red vial) by adding 100 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. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A1.3.2 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 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 sample, reconstituted *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* 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 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 strips or plate in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

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 sec	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 sec	60°C

Table A1 6. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*C. trachomatis*), ROX (*N. gonorrhoeae*) and HEX, JOE or VIC (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ANNEX 2

TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-CTN196T

Table A2. 1. References.

A2.1 Principle of the procedure

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit contains in each Reaction-Mix tube all the components necessary for 24 real time PCR reactions (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to discard the inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
<i>C. trachomatis</i>	FAM	ORF2 gene
<i>N. gonorrhoeae</i>	ROX	<i>porA</i> and <i>opa</i> genes
Internal Control (IC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A2. 2. Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, channel, to check most common detection channels consult website www.certest.es.

A2.2 Reagents provided

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A2.3.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	White	4 vials
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> 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

Table A2. 3. Reagents and materials provided in VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CTN196T.

A2.3 Test procedure

A2.3.1 Lyophilized positive control

N. gonorrhoeae + *C. trachomatis* 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 *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control (red vial) by adding 100 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. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A2.3.2 Lyophilized reaction mix tube

Determine the number of required reactions including samples and controls (one positive and negative control must be included in each run). Obtain the correct number of lyophilized Reaction-Mix vials (24-reactions each one) for testing.

Recommendation is to open and manipulate the *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Reaction-Mix tube in pre-PCR laboratory area. Open lyophilized Reaction-mix tube (white vial) carefully to avoid disruption of the pellet and add 390 µL of Rehydration Buffer (blue vial) supplied. Mix gently by pipetting up and down. Spin down briefly to remove bubbles generated during mixing.

Once the Reaction-Mix tube has been re-suspended, return unused reagents to the appropriate storage conditions at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The volume of the rehydrated Reaction-Mix is sufficient for 24 reactions. The rehydrated Reaction-Mix may be kept at 25°C±5°C or 2-8°C for up to 4-hours (see Transport and storage conditions section for additional storage options).

A2.3.3 PCR protocol

- 1) Adding rehydrated Reaction-Mix to the number of required wells.

Add 15 µL of rehydrated *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Reaction-Mix (white vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close the tubes with caps or seal the plate. Centrifuge briefly.

Load the plate, the strips, or tubes in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.cerTEST.es).

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 sec	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 sec	60°C

Table A2. 4. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*C. trachomatis*), ROX (*N. gonorrhoeae*) and HEX, JOE or VIC (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ANNEX 3

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-CTN106LE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-CTN106HE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-CTN112LE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-CTN112HE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-CTN113LE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-CTN113HE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CTN136E
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CTN172E
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-CTN101LE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-CTN101HE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CTN101E

Table A3. 1. References.

A3.1 Principle of the procedure

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format. The assay can use an Extraction Control (EC) which can be introduced into each sample at the lysis buffer stage of the extraction process. This control can be used to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
<i>C. trachomatis</i>	FAM	ORF2 gene
<i>N. gonorrhoeae</i>	ROX	<i>porA</i> and <i>opa</i> genes
Extraction Control (EC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A3. 2. Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult website www.certest.es.

A3.2 Reagents provided

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables A3.3, A3.4 and A3.5. 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 A3.3 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices. Table A3.4 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible devices. Table A3.5 includes

materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips. (Consult the thermocycler compatibility on CerTest's website www.cerTEST.es).

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	1/6/12 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	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	1/6/12 x 8-cap strip

Table A3. 3. Reagents and materials provided in VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CTN101LE, VS-CTN101HE, VS-CTN106LE, VS-CTN106HE, VS-CTN112LE and VS-CTN112HE.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	1 plate
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	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 plate during thermal cycling	Transparent	12 x 8-cap strip

Table A3. 4. Reagents and materials provided in VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-CTN113LE and VS-CTN113HE.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	Transparent	2/9/18 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	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	Caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	2/9/18 x 4-cap strip

Table A3. 5. Reagents and materials provided in VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CTN101E, VS-CTN136E and VS-CTN172E. 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).

A3.3 Test procedure

A3.3.1 Lyophilized extraction control

Recommendation is to open and manipulate the Extraction Control (EC) in pre-PCR laboratory area away from the lyophilized positive control. Reconstitute the lyophilized Extraction Control (green vial) by adding 500 µL of Water RNase/DNase free (white vial) supplied and vortex thoroughly.

Once the Extraction Control has been re-suspended, store it at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The Water RNase/DNase free vial must be utilized first to reconstitute the lyophilized Extraction Control in pre-PCR laboratory area, and subsequently, it can be used to reconstitute the lyophilized *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control in an area away from the other components.

A3.3.2 Lyophilized positive control

N. gonorrhoeae + *C. trachomatis* 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 *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control (red vial) by adding 100 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. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A3.3.3 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 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 Negative Control (violet vial) in the reserved wells for negative control.

Add 5 µL of DNA sample in different wells.

Add 5 µL of reconstituted *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control (red vial) in the reserved wells for positive control.

If the EC is only used as PCR inhibition control, add 1 µL of the EC (green vial) to the negative control/sample/positive control wells.

It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips, 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® kit).

Load the strips or plate in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

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 sec	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 sec	60°C

Table A3. 6. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*C. trachomatis*), ROX (*N. gonorrhoeae*) and HEX, JOE or VIC (Extraction Control (EC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ANNEX 4

TUBE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-CTN196TE

Table A4. 1. References.

A4.1 Principle of the procedure

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit contains in each Reaction-Mix tube all the components necessary for 24 real time PCR reactions (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format. The assay can use an Extraction Control (EC) which can be introduced into each sample at the lysis buffer stage of the extraction process. This control can be used to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
<i>C. trachomatis</i>	FAM	ORF2 gene
<i>N. gonorrhoeae</i>	ROX	<i>porA</i> and <i>opa</i> genes
Extraction Control (EC)	HEX, VIC or JOE *	-

Table A4. 2. Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult website www.certest.es.

A4.2 Reagents provided

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A4.3.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	4 vials
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	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

Table A4. 3. Reagents and materials provided in VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CTN196TE.

A4.3 Test procedure

A4.3.1 Lyophilized extraction control

Recommendation is to open and manipulate the Extraction Control (EC) in pre-PCR laboratory area away from the lyophilized positive control. Reconstitute the lyophilized Extraction Control (green vial) adding 500 µL of Water RNase/DNase free (white vial) supplied and vortex thoroughly.

Once the Extraction Control has been re-suspended, store it at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The Water RNase/DNase free vial must be utilized first to reconstitute the lyophilized Extraction Control in pre-PCR laboratory area, and subsequently, it can be used to reconstitute the lyophilized *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control in an area away from the other components.

A4.3.2 Lyophilized positive control

N. gonorrhoeae + *C. trachomatis* 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 *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control (red vial) by adding 100 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. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A4.3.3 Lyophilized reaction mix tube

Determine the number of required reactions including samples and controls (one positive and negative control must be included in each run). Obtain the correct number of lyophilized Reaction-Mix vials (24-reactions each one) for testing.

Recommendation is to open and manipulate the *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Reaction-Mix tube in pre-PCR laboratory area. Open lyophilized Reaction-mix tube (white vial) carefully to avoid disruption of the pellet and add 390 µL of Rehydration Buffer (blue vial) supplied. Mix gently by pipetting up and down. Spin down briefly to remove bubbles generated during mixing.

Once the Reaction-Mix tube has been re-suspended, return unused reagents to the appropriate storage conditions at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The volume of the rehydrated Reaction-Mix is sufficient for 24 reactions. The rehydrated Reaction-Mix may be kept at 25°C±5°C or 2-8°C for up to 4-hours (see Transport and storage conditions section for additional storage options).

A4.3.4 PCR protocol

- 1) Adding rehydrated Reaction-Mix to the number of required wells.

Add 15 µL of rehydrated *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Reaction-Mix (white vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of Negative Control (violet vial) in the reserved wells for negative control.

Add 5 µL of DNA sample in different wells.

Add 5 µL of reconstituted *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control (red vial) in the reserved wells for positive control.

If the EC is only used as PCR inhibition control, add 1 µL of the EC (green vial) to the negative control/sample/positive control wells.

Close the wells with the caps provided. Centrifuge briefly.

Load the plate, the strips or tubes in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

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 sec	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 sec	60°C

Table A4. 4. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*C. trachomatis*), ROX (*N. gonorrhoeae*) and HEX, JOE or VIC (Extraction Control (EC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit es una prueba de PCR en tiempo real diseñada para la detección cualitativa y simultánea, así como para la identificación del DNA de *N. gonorrhoeae* y/o *C. trachomatis*, en muestras de orina uretral, hisopos uretrales, hisopos rectales, hisopos/exudados endocervicales, de hisopos vaginales y orofaríngeos procedentes de personas con sospecha de padecer gonorrea y/o clamidia, recogidas por su profesional de la salud (PS). El uso previsto de este test es facilitar el diagnóstico de la infección causada por *N. gonorrhoeae* y/o *C. trachomatis*, en combinación con factores de riesgo clínicos y epidemiológicos. El DNA se extrae de muestras clínicas, se amplifica mediante PCR a tiempo real y se detecta utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*), específicos para *N. gonorrhoeae* y/o *C. trachomatis*.

2. Introducción y explicación

Las Enfermedades de Transmisión Sexual (ETS) suponen un gran problema de salud a nivel mundial, ya que afecta a la calidad de vida y causa una grave morbilidad y mortalidad. En particular, la gonorrea y la clamidia son dos enfermedades que representan la gran mayoría de ETS bacterianas.

N. gonorrhoeae es una bacteria (gonococo) conocido a nivel mundial principalmente como el agente etiológico de la gonorrea. *N. gonorrhoeae* provoca comúnmente infecciones en la mucosa del tracto urogenital, infectando predominantemente el epitelio columnar y transicional, aunque también puede adherirse al epitelio escamoso estratificado del ectocérvix. Dichas infecciones por *N. gonorrhoeae* resultan muy frecuentemente en uretritis masculina y en cervicitis femenina, pero la uretritis también se ha descrito en mujeres. La mayoría de los pacientes varones que presentan uretritis gonococal son sintomáticos, sin embargo, las mujeres con uretritis sintomática se encuentran en una proporción sustancialmente menor, y cuando dichos síntomas se presentan, resultan ser inespecíficos. Si las infecciones no son detectadas y/o tratadas adecuadamente, pueden producirse infecciones ascendentes, tales como epididimitis y la salpingitis, que dan lugar a secuelas y complicaciones severas, particularmente en mujeres, que sufren la mayor parte de casos de la enfermedad; estas complicaciones y secuelas incluyen la enfermedad inflamatoria pélvica (EPI), dolor pélvico crónico, embarazo ectópico e infertilidad.

C. trachomatis es una bacteria gram-negativa, parte del género *chlamydophila*, responsable de la enfermedad de transmisión sexual denominada clamidia. En Estados Unidos, en la enfermedad bacteriana más reportada, y a nivel global, es la ETS más común. Los tres "biovars" de *C. trachomatis*, cada uno consistente en varios "serovars" o genotipos, causan infecciones genitales, linfogranuloma venéreo (LGV: una enfermedad ulcerativa genital que afecta al tejido linfoide) y una enfermedad ocular denominada "tracoma", que es la principal causa infecciosa de ceguera a nivel mundial. La infección en mujeres puede manifestarse como cervicitis, uretritis, enfermedad inflamatoria pélvica, perihepatitis o proctitis, mientras que, en hombres, la infección puede dar lugar a uretritis, epididimitis, prostatitis, proctitis o artritis reactiva.

Las manifestaciones clínicas de la clamidia y gonorrea son variables e inespecíficas, de ahí que sea necesaria la identificación del patógeno responsable de la sintomatología existente. El diagnóstico de *N. gonorrhoeae*

puede llevarse a cabo con cultivos microbiológicos, que son específicos y económicos, con una sensibilidad razonable del 85-95% para infecciones uretrales y endocervicales. La tinción gram-negativa de frotis pueden dar un diagnóstico hipotético de gonorrea, especialmente en hombres sintomáticos con uretritis. Sin embargo, solo el 50-70% de las infecciones asintomáticas en hombres resultan positivas con la tinción gram.

Aunque *C. trachomatis* puede diagnosticarse mediante cultivo, los ensayos de inmunofluorescencia directa (DFAs) y ensayos ELISA tanto en laboratorios como en puntos de atención primaria, las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAATs) son muy recomendables por superioridad en cuanto a características de rendimiento se refiere.

Los ensayos NAATs son pruebas de diagnóstico altamente sensibles y específicas que pueden utilizarse con un amplio rango de muestras, y tienen una sensibilidad superior al 90%, que es mayor que la de las pruebas basadas en cultivo celular (> 85%).

3. Procedimiento

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección cualitativa e identificación del DNA de *N. gonorrhoeae* y/o *C. trachomatis*, a partir de muestras de orina uretral, hisopos uretrales, hisopos rectales, hisopos/exudados endocervicales, de hisopos vaginales y orofaríngeos. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *N. gonorrhoeae* y/o *C. trachomatis* se realiza mediante la amplificación de una región conservada del gen ORF2 (*C. trachomatis*) y de los genes *porA* y *opa* (*N. gonorrhoeae*), usando cebadores específicos y sondas marcadas con fluorescencia.

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit se basa en la actividad exonucleasa 5' 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. Dicha fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para el ensayo de PCR en tiempo real (cebadores / sondas específicas, dNTPs, tampón, polimerasa) en un formato estabilizado, así como un control interno con el que verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación.

4. Reactivos suministrados

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit incluye los materiales y reactivos detallados en el Anexo 1 para "open format" y "rotor-gene format" con control interno, el Anexo 2 para formato de tubo con de control interno, el Anexo 3 para "open format" y "rotor-gene format" con control de extracción, y el Anexo 4 para formato de tubo con de control de extracción.

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 *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo, tubos individuales, tiras de tubos y/o placas). Solo para formato tubo (Anexos 2 y 4).
- Kit de extracción de DNA.
- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio: - 30°C a - 10°C y / o $\leq -70^{\circ}\text{C}$.
- 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®). Solo para formato Rotor Gene (Anexos 1 y 3).

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems), CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), StepOne™ Real Time PCR System (Applied Biosystems), AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies), DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology), DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology), Rotor-Gene® Q (Qiagen), Cobas z480 Analyzer (Roche Diagnostics) y VIASURE V-Lab96 Cycler (CerTest Biotec S.L.). Para comprobar la compatibilidad del termociclador y los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es.

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.

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.
- Para kits en formato tubo: Una vez el vial *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Reaction-Mix ha sido reconstituido, puede mantenerse a 25°C $\pm$ 5°C o 2-8°C hasta 4 horas. Para períodos de tiempo prolongados,

se recomienda almacenar a -20°C y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado, instruido y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico *in vitro* (incluida la capacitación en el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácido nucleico).
- Para diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- 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 (para las referencias VS-CTN113L, VS-CTN113H, VS-CTN136, VS-CTN172, VS-CTN113LE, VS-CTN113HE, VS-CTN136E y VS-CTN172E). 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-CTN101, VS-CTN136, VS-CTN172, VS-CTN101E, VS-CTN136E y VS-CTN172E (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.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- 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. Use áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles para evitar resultados falsos positivos.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit y cualquier otro reactivo y equipo adicional que se necesite para realizar el ensayo no estén contaminados. Evite en todo momento la contaminación microbiana y de ribonucleasa (RNasa)/desoxirribonucleasa (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos.

- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar o aplicar productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o biopeligrosas, 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.
- Las muestras y los reactivos deben ser manejados en una cabina de seguridad biológica. Utilice equipo de protección personal (PPE) de acuerdo con las directrices actuales para la manipulación de muestras potencialmente infecciosas. Deseche los residuos de acuerdo con las regulaciones locales y estatales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- De conformidad con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits no requieren ficha de datos de seguridad, debido a que se clasifican como no peligrosos para la salud y el medio ambiente por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (CLP), o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

Consulte el Anexo 1 para el "open format" y "rotor-gene format" con productos con control interno, el Anexo 2 para formato de tubo con productos con control interno, el Anexo 3 para el formato open format" y "rotor-gene format" con productos con control de extracción, y el Anexo 4 para formato de tubo con productos con control de extracción.

8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit ha sido testado en orina uretral recogida en tubos estériles (VACUETTE, Greiner bio-one), hisopos uretrales, rectales, hisopos/exudados endocervicales, hisopos vaginales y orofaríngeos. Las muestras tomadas con hisopos se recogieron en hisopos estériles de un solo uso con nailon flocado "Copan Liquid Amies Elution Swab (ESwab™)", en 1 mL de medio de conservación "Liquid Amies" (COPAN innovation). Otros tipos de muestras deben ser validados por el usuario.

La recolección, el almacenamiento y el transporte de las muestras deben mantenerse según las condiciones validadas por el usuario. En general, todas las muestras deben recolectarse y etiquetarse adecuadamente en recipientes limpios. Después de la recolección, las muestras deben colocarse en una bolsa de riesgo biológico y deben transportarse y procesarse lo antes posible para garantizar la calidad de la prueba. Las muestras de orina y los exudados cervicales deben transportarse a temperatura ambiente durante un máximo de 1 hora, siguiendo las normativas locales y nacionales para el transporte de material patógeno. Para el transporte a largo plazo (más de 1 hora), recomendamos el envío a -20 ° C o menos. Las muestras recogidas en el Sistema de Recolección y Conservación ESwab® deben transportarse a 20-25° C hasta 5 días, o a 4° C hasta 7 días, siguiendo las normativas locales y nacionales para el transporte de material patógeno. Para el transporte a largo

plazo (más de 7 días), recomendamos el envío a -20 ° C o menos **si el medio de conservación lo permite**. Recomendamos seguir unas pautas de laboratorio apropiadas y/o las recomendaciones del fabricante para una correcta conservación de las muestras en el medio de recogida y transporte seleccionado. Deben evitarse ciclos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con las pautas de laboratorio apropiadas. Para obtener más información, consulte la guía IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94), y García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cencenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

8.2. 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.

Debido a que VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit también está disponible con control de extracción (las referencias se incluyen en los Anexos 3 y 4), si el control de extracción (CE) se usa para monitorear el aislamiento de ácido nucleico y como control de inhibición de la PCR, agregue 5µl del CE reconstituido a la muestra y/o mezcla de tampón de lisis (muestra clínica, así como control positivo y/o control negativo). Cierre cada tubo y agite en el vórtex durante 10 segundos. Si el control de extracción se usa solo como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1µl del CE reconstituido a la mezcla de reacción reconstituida.

Para la extracción de DNA a partir muestras clínicas puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático o 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:

- MagDEA Dx SV Kit, empleando el equipo de extracción magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).
- StarMag 96x4 Universal Cartridge (Seegene), using the Microlab STAR Let automatic extraction system (Hamilton).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

9. Interpretación de resultados

9.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)

Todo el resultado de la prueba debe ser evaluado por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico. Compruebe la señal de control interno (CI) para

verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante.

Se recomienda establecer los valores umbral para cada canal (diana) de forma independiente por parte del usuario final. Utilizar la curva de amplificación del control positivo como punto de partida durante la validación de la ejecución (antes de la interpretación de los resultados de la muestra del paciente), para asegurarse de que los umbrales caen dentro de la fase exponencial de las curvas de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo. El valor umbral para diferentes instrumentos puede variar debido a diferentes intensidades de señal.

El uso de controles positivos y negativos en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo de control negativo y la presencia de señal en el pocillo de control positivo para *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*.

Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	<i>C. trachomatis</i> (FAM) ¹	<i>N. gonorrhoeae</i> (ROX) ¹	Control Interno (HEX) ²	Interpretación de controles
Control Positivo (CP)	≤40	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (CN)	> 40 o no señal	> 40 o no señal	≤40	Válido

Tabla 1. Rendimiento esperado de los controles. Ct no señal = sin curva de amplificación.

1. En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo de control positivo para cualquier canal diana), todos los resultados se consideran "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.
2. El Control Interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40) en los pocillos del CP y CN.

La valoración de los resultados de las muestras clínicas debe realizarse tras el examen de los resultados de los controles positivo y negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados del paciente no se pueden interpretar.

Para la interpretación de los resultados de la muestra individual del paciente, use la siguiente tabla:

<i>C. trachomatis</i> (FAM)	<i>N. gonorrhoeae</i> (ROX)	Control Interno (HEX)	Interpretación para muestras individuales de pacientes	
≤40	> 40 o no señal	≤40 o no señal ¹	Válido	DNA de <i>C. trachomatis</i> Detectado
> 40 o no señal	≤40	≤40 o no señal ¹	Válido	DNA de <i>N. gonorrhoeae</i> Detectado
≤40	≤40	≤40 o no señal ¹	Válido	DNA de <i>C. trachomatis</i> y <i>N. gonorrhoeae</i> Detectado
> 40 o no señal	> 40 o no señal	≤35 ²	Válido	Dianas no Detectadas
> 40 o no señal	> 40 o no señal	> 35 o no señal ²	Inválido	Test Fallido – Repita el Test ²

Tabla 2. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct no señal = sin curva de amplificación.

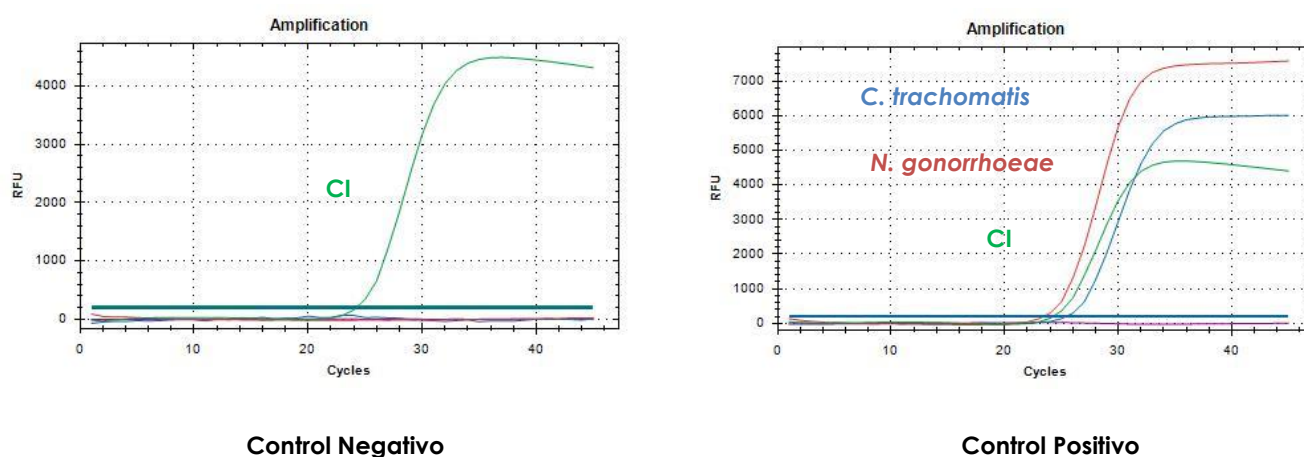
- 1 El control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal). En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.
- 2 En el caso de que los genes diana de *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* resulten negativos, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤ 35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct > 35 del control interno, el

resultado se considera "invalido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1: 100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR y revisar los parámetros; verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. También se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. Según el material disponible:

- Repetir la qPCR con la misma muestra de DNA aislada, o
- Volver a extraer y volver a analizar otra alícuota de la misma muestra o,
- Obtener una nueva muestra y volver a realizar la prueba.

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).



9.2. Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexos 3 y 4)

Todo el resultado de la prueba debe ser evaluado por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico. Compruebe la señal del control de extracción (CE) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante.

Se recomienda establecer los valores umbral para cada canal (diana) de forma independiente por parte del usuario final. Utilizar la curva de amplificación del control positivo como punto de partida durante la validación de la ejecución (antes de la interpretación de los resultados de la muestra del paciente), para asegurarse de que los umbrales caen dentro de la fase exponencial de las curvas de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo. El valor umbral para diferentes instrumentos puede variar debido a diferentes intensidades de señal.

El uso de controles positivo y negativo en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal para *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* en el pocillo de control positivo.

Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	<i>C. trachomatis</i> (FAM) ¹	<i>N. gonorrhoeae</i> (ROX) ¹	Control de Extracción (HEX) ²	Interpretación de controles
Control Positivo (CP)	≤40	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (CN)	> 40 o no señal	> 40 o no señal	≤40	Válido

Tabla 3. Rendimiento esperado de los controles. Ct no señal = sin curva de amplificación.

1 En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo de control positivo para cualquier canal diana), todos los resultados se consideran "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El Control de Extracción (CE) debería mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40) en los pocillos del CP y CN.

La valoración de los resultados de las muestras clínicas debe realizarse tras el examen de los resultados de los controles positivo y negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados del paciente no se pueden interpretar.

Para la interpretación de los resultados de la muestra individual del paciente, use la siguiente tabla:

<i>C. trachomatis</i> (FAM)	<i>N. gonorrhoeae</i> (ROX)	Control de Extracción (HEX)	Interpretación para muestras individuales de pacientes	
≤40	> 40 o no señal	≤40 o no señal ¹	Válido	DNA de <i>C. trachomatis</i> Detectado
> 40 o no señal	≤40	≤40 o no señal ¹	Válido	DNA de <i>N. gonorrhoeae</i> Detectado
≤40	≤40	≤40 o no señal ¹	Válido	DNA de <i>C. trachomatis</i> y <i>N. gonorrhoeae</i> Detectado
> 40 o no señal	> 40 o no señal	≤35 ²	Válido	Dianas no Detectadas
> 40 o no señal	> 40 o no señal	> 35 o no señal ²	Inválido	Test Fallido – Repita el Test ²

Tabla 4. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct no señal = sin curva de amplificación.

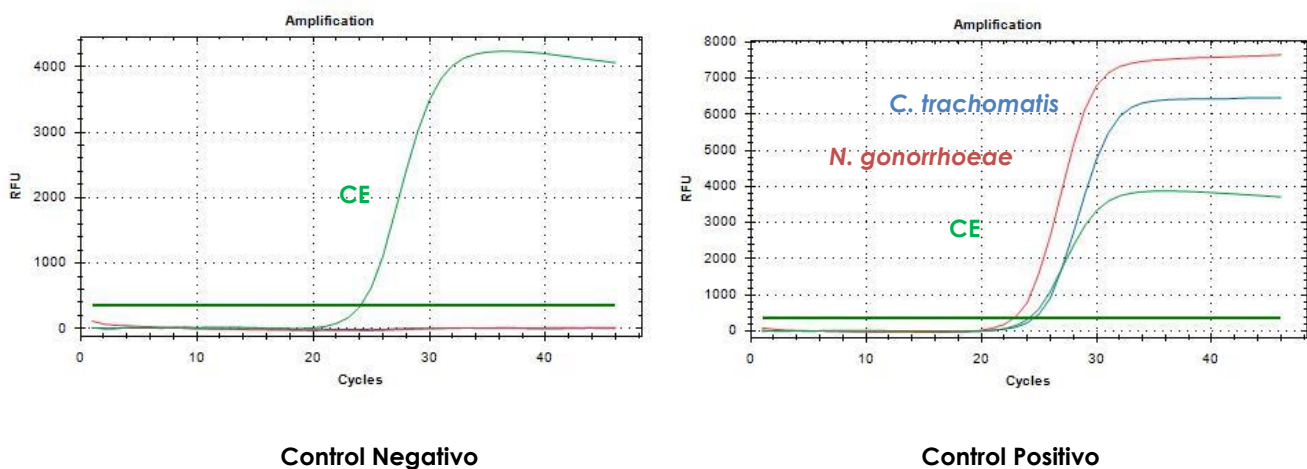
1 El Control de Extracción (CE) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal). En ocasiones, la detección del control de extracción no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. Se pueden observar diferencias en los valores de Ct de los controles de extracción entre los controles y las muestras clínicas, debido al proceso de extracción.

2 En el caso de que los genes diana de *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis* resulten negativos, el CE debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤ 35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct > 35 del control de extracción, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1: 100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR y revisar los parámetros; verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. También se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. Según el material disponible:

- Repetir la qPCR con la misma muestra de DNA aislada, o
- Volver a extraer y volver a analizar otra alícuota de la misma muestra o,
- Obtener una nueva muestra y volver a realizar la prueba.

Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).



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 de orina uretral, hisopos uretrales, hisopos rectales, hisopos/exudados endocervicales, hisopos vaginales y orofaríngeos.
- ON 0318 solo interviene en la evaluación de la conformidad de la prueba para *Chlamydia trachomatis*. El alcance de la certificación CE cubre la detección de *Chlamydia trachomatis* en muestras de orina uretral, hisopos uretrales, hisopos rectales, hisopos endocervicales / exudado, hisopos vaginales y orofaríngeos. El resto de patógenos cuentan con autocertificación para el marcado CE.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba es una prueba cualitativa y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes.
- 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 obtener resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada por *N. gonorrhoeae* y/o *C. trachomatis*, 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.
- Existe la posibilidad de obtener falsos positivos debido a la contaminación cruzada entre el Control de Extracción y *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control, el cual contiene un elevado número de copias molde, durante su reconstitución al añadir el agua libre RNAsa/DNAsa (vial blanco). Cada uno de los procesos se debe de llevar a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:

- Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
- Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de DNA).
- Degradación del DNA durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
- Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de *N. gonorrhoeae* y/o *C. trachomatis*.
- Una carga bacteriana en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
- La presencia de inhibidores de qPCR u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de las vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir infecciones por *N. gonorrhoeae* y/o *C. trachomatis* o durante el tratamiento de la infección.
- No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de bacterias viables y no implica que dichas bacterias sean infecciosas o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias diana de *N. gonorrhoeae* y/o *C. trachomatis*.
- Resultados negativos no excluyen padecer infección por *N. gonorrhoeae* y/o *C. trachomatis*, y no deben usarse como la única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. No se han determinado los tipos de muestras óptimas y el momento en el que se alcanzan los máximos niveles de la carga bacteriana durante las infecciones causadas por *N. gonorrhoeae* y/o *C. trachomatis*. La recolección de múltiples muestras (tipos de muestras y en varios puntos a lo largo del tiempo) del mismo paciente puede ser necesaria para detectar la/las bacterias.
- Si las pruebas de diagnóstico de otras Enfermedades de Transmisión Sexual (ETS) son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por *N. gonorrhoeae* y/o *C. trachomatis*, entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como: equipo de PCR utilizado, sistema de extracción, tipo de muestra, tratamiento previo de la muestra etc.... entre otros.

11. Control de calidad

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* 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) o el Control de Extracción (CE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

El rendimiento clínico de VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit se probó utilizando muestras genitourinarias (orina uretral, hisopos uretrales, rectales, vaginales, e hisopos/exudados endocervicales y orofaríngeos), mediante la realización de una evaluación clínica en colaboración con entidades nacionales. En la siguiente tabla se incluye un resumen de las localizaciones, tipos de muestra y flujo de trabajo aplicado.

	Lugar	Tipo de muestra	Flujo de trabajo	Diana
1	Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario Miguel Servet, (Zaragoza, España)	Orina uretral	StarMag 96x4 Universal Cartridge (Seegene) empleando el equipo Microlab STAR Let automatic extraction system (Hamilton) + DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	<i>N. gonorrhoeae</i>
		Hisopos uretrales		<i>C. trachomatis</i>
		Hisopos rectales		
		Hisopos/exudados endocervicales		
		Hisopos vaginales		
		Hisopos orofaríngeos		

Tabla 5. Lugar, tipo de muestra, flujo de trabajo y diana.

Los valores positivos y negativos verdaderos, los falsos negativos y falsos positivos, la sensibilidad, la especificidad, el PPV, los valores de NPV para VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit se calcularon en relación con cada ensayo comparador, como se muestra en la siguiente tabla:

Lugar	Kit comparador	Diana	TP	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
1	Allplex™ STI Essential Assay (Seegene)	<i>C. trachomatis</i>	Todos los tipos	301	597	0	1	0.99 (0.98-1)	1 (0.99-1)	1 (0.98-1)	0.99 (0.98-0.99)
			Orina uretral	15	60	0	0	1 (0.78-1)	1 (0.94-1)	1 (0.78-1)	1 (0.94-1)
			Hisopos uretrales	78	152	0	0	1 (0.95-1)	1 (0.97-1)	1 (0.95-1)	1 (0.97-1)
			Hisopos rectales	13	59	0	1	0.92 (0.66-0.99)	1 (0.93-1)	1 (0.71-1)	0.98 (0.89-0.99)
			Hisopos/exudados endocervicales	143	150	0	0	1 (0.97-1)	1 (0.97-1)	1 (0.97-1)	1 (0.97-1)
			Hisopos vaginales	46	57	0	0	1 (0.92-1)	1 (0.93-1)	1 (0.92-1)	1 (0.93-1)
			Hisopos orofaríngeos	6	119	0	0	1 (0.54-1)	1 (0.96-1)	1 (0.54-1)	1 (0.96-1)
		<i>N. gonorrhoeae</i>	Todos los tipos	151	623	0	0	1 (0.97-1)	1 (0.99-1)	1 (0.97-1)	1 (0.99-1)
			Orina uretral	12	63	0	0	1 (0.73-1)	1 (0.75-1)	1 (0.73-1)	1 (0.75-1)
			Hisopos uretrales	86	144	0	0	1 (0.95-1)	1 (0.97-1)	1 (0.95-1)	1 (0.97-1)
			Hisopos rectales	11	62	0	0	1 (0.71-1)	1 (0.94-1)	1 (0.71-1)	1 (0.94-1)
			Hisopos/exudados endocervicales	33	260	0	0	1 (0.89-1)	1 (0.98-1)	1 (0.89-1)	1 (0.98-1)
			Hisopos vaginales	9	94	0	0	1 (0.66-1)	1 (0.96-1)	1 (0.66-1)	1 (0.96-1)
			Hisopos orofaríngeos	25	100	0	0	1 (0.86-1)	1 (0.96-1)	1 (0.86-1)	1 (0.96-1)

Tabla 6. Valores verdaderos positivos (TP) y valores verdaderos negativos (TN), falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN), sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (PPV) y valor predictivo negativo (NPV) para VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit.

Los resultados muestran una alta concordancia para detectar *N. gonorrhoeae* y/o *C. trachomatis* utilizando VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit presenta un límite de detección de 5 copias de DNA por reacción para *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* con una tasa de positividad de $\geq 95\%$, en muestras clínicas de hisopos vaginales.

Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar del *C. trachomatis* (10^7 - 10^1 copies/rxn). Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal FAM).

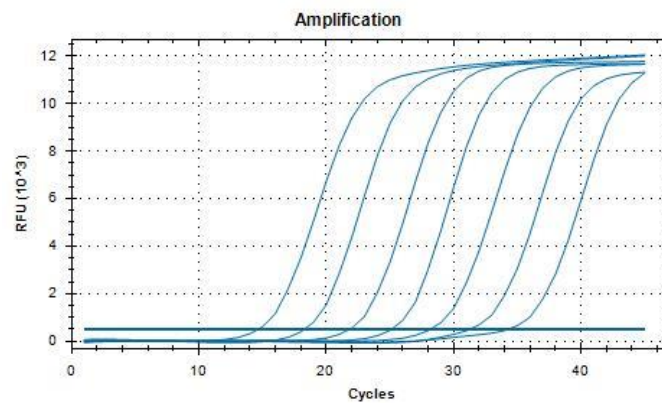


Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar del *N. gonorrhoeae* (gen *porA*) (10^7 - 10^1 copies/rxn). Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal ROX).

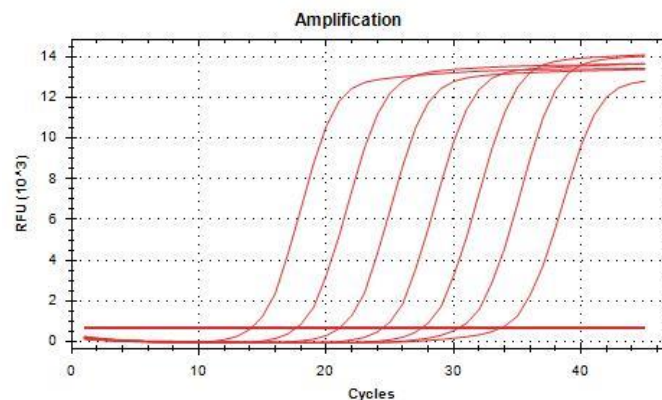
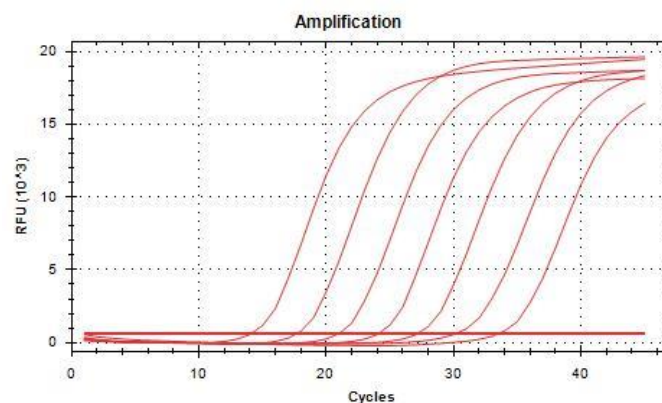


Figura 5. Diluciones seriadas de un estándar del *N. gonorrhoeae* (gen *opa*) (10^7 - 10^1 copies/rxn). Experimento realizado en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) (canal ROX).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad de VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos asociados a Enfermedades de Transmisión Sexual. No se detectaron reacciones cruzadas de VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit con ninguno de los siguientes microorganismos testados.

Prueba de reactividad cruzada					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Escherichia coli</i> cepa 0.1285; O18:H7:K1	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo A	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Haemophilus ducreyi</i> cepa Class 1	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> cepa Minn A	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Candida dubliniensis</i>	-	Virus Hepatitis A	-	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	Herpes Simplex Virus 1 cepa Macintyre	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Candida krusei</i> (<i>Issatchenkia orientalis</i>)	-	Herpes Simplex Virus 2 cepa MS	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	Human Papillomavirus tipos 16 y 18	-	<i>Streptococcus agalactiae</i> cepa 2019	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa 2022	-
Citomegalovirus cepa AD-169	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> serotipo Capsular 2	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> serotipo Cloaca B	-	<i>Listeria innocua</i> serotipo 6a	-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-
<i>Enterobacter cloacae</i> serotipo Cloaca A	-	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> serovar 5	-	<i>Ureaplasma parvum</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 4b	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
<i>Enterococcus faecium</i> serotipo 11	-	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-		

Tabla 7. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio realizado en Certest.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit para *C. trachomatis* se evaluó frente a DNA extraído de *Chlamydia trachomatis* cepa Swedish; *Chlamydia trachomatis* serovar D, E, F, I, J, K y *Chlamydia trachomatis* cepa LGV (como referencias), mostrando resultados positivos.

La reactividad de VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit para *N. gonorrhoeae* se evaluó frente a DNA extraído de *Neisseria gonorrhoeae* cepa 49226, *Neisseria gonorrhoeae* cepa Lvl Ng PorA y *Neisseria gonorrhoeae* cepa NCTC 8375 [B 5025] (como referencias), mostrando resultados positivos.

ANEXO 1

FORMATO OPEN Y ROTOR-GENE CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIAS
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-CTN106L
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-CTN106H
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-CTN112L
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-CTN112H
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-CTN113L
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-CTN113H
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CTN136
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CTN172
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-CTN101L
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-CTN101H
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CTN101

Tabla A1. 1. Referencias

A1.1 Procedimiento

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* 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.

Diana	Canal	Gen
<i>C. trachomatis</i>	FAM	gen ORF2
<i>N. gonorrhoeae</i>	ROX	genes <i>porA</i> y <i>opa</i>
Control Interno (CI)	HEX, VIC o JOE *	-

Tabla A1. 2. Diana, canal y genes.

*Seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.ceratest.es.

A1.2 Reactivos suministrados

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A1.3, A1.4 y A1.5. Según la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos, y por tanto, comercializar en múltiples formatos. La Tabla A1.3 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A1.4 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos. La Tabla A1.5 incluye materiales y reactivos para usar con los

instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.cerTEST.es).

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado	Blanco	1/6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</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	1/6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A1.3. Reactivos y materiales proporcionados VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CTN101L, VS-CTN101H, VS-CTN106L, VS-CTN106H, VS-CTN112L y VS-CTN112H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</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	12 tiras de 8 tapones

Tabla A1. 4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CTN113L y VS-CTN113H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado	Transparente	2/9/18 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</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 para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	2/9/18 tiras de 4 tapones

Tabla A1.5. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CTN101, VS-CTN136 y VS-CTN172. Para uso en Qiagen/Corbett Rotor-Gene® y compatible con accesorios con tiras de 4 tubos 0,1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

A1.3 Procedimiento del test

A1.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* 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 *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 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.

A1.3.2 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 tiras.

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

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 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 las tiras o la placa en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

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

Ciclos	Etapas	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 A1. 6. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*C. trachomatis*), ROX (*N. gonorrhoeae*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno (CI)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

ANEXO 2

FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-CTN196T

Tabla A2. 1. Referencias.

A2.1 Procedimiento

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de 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.

Diana	Canal	Gen
<i>C. trachomatis</i>	FAM	gen ORF2
<i>N. gonorrhoeae</i>	ROX	genes <i>porA</i> y <i>opa</i>
Control Interno (CI)	HEX, VIC o JOE *	-

Tabla A2. 2. Diana, canal y genes.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.cer-test.es.

A2.2 Reactivos suministrados

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A2.3.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y control interno en formato estabilizado	Blanco	4 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</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

Tabla A2. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CTN196T.

A2.3 Procedimiento del test

A2.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* 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 *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 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.

A2.3.2 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

A2.3.3 Protocolo PCR

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

Añadir 15 µL de *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los tubos con los tapones o sellar la placa. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

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

Ciclos	Etapas	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 A2. 4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los FAM (*C. trachomatis*), ROX (*N. gonorrhoeae*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno (CI)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

ANEXO 3

FORMATO OPEN Y ROTOR-GENE CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIAS
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-CTN106LE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-CTN106HE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-CTN112LE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-CTN112HE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-CTN113LE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-CTN113HE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CTN136E
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CTN172E
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-CTN101LE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-CTN101HE
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-CTN101E

Tabla A3. 1. Referencias.

A3.1 Procedimiento

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* 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. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede añadirse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
<i>C. trachomatis</i>	FAM	gen ORF2
<i>N. gonorrhoeae</i>	ROX	genes <i>porA</i> y <i>opa</i>
Control de Extracción (CE)	HEX, VIC o JOE *	-

Tabla A3. 2. Diana, canal y genes.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A3.2 Reactivos suministrados

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A3.3, A3.4 y A3.5. Según la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos, y por tanto, comercializar en múltiples formatos. La Tabla A3.3 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A3.4 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos

compatibles para placas de 96 pocillos. La Tabla A3.5 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	1/6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	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	1/6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A3.3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CTN101LE, VS-CTN101HE, VS-CTN106LE, VS-CTN106HE, VS-CTN112LE y VS-CTN112HE.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	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	12 tiras de 8 tapones

Tabla A3. 4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CTN113LE y VS-CTN113HE.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	2/9/18 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	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 para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	2/9/18 tiras de 4 tapones

Tabla A3. 5. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CTN101E, VS-CTN136E y VS-CTN172E. 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).

A3.3 Procedimiento del test

A3.3.1 Control de extracción liofilizado

Se recomienda abrir y manipular el control de extracción (CE) en el área pre-PCR del laboratorio, alejada del control positivo liofilizado. Reconstituir el Control de Extracción liofilizado (vial verde) añadiendo 500 µL del Agua libre de RNasa/DNasa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el Control de Extracción a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: Se debe utilizar en primer lugar el vial de Agua libre de RNasa/DNasa para reconstituir el Control de Extracción liofilizado en el área pre-PCR del laboratorio, y después se debe usar para reconstituir el *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A3.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* 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 *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 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.

A3.3.3 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 tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de Negative Control (vial morado) en los pocillos reservados para el control negativo.

Añadir 5 µL de la muestra de DNA en los diferentes pocillos.

Añadir 5 µL de *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

Si el CE se utiliza sólo como control de la inhibición de la PCR, añadir 1 µL del CE (vial verde) a los pocillos en los que se encuentre la muestra/control positivo/control negativo.

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 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 las tiras o placa en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

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

Ciclos	Etapas	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 A3. 6. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*C. trachomatis*), ROX (*N. gonorrhoeae*) y HEX, JOE o VIC (Control de Extracción (CE)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

ANEXO 4

FORMATO TUBO CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-CTN196TE

Tabla A4. 1. Referencias.

A4.1 Procedimiento

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede añadirse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
<i>C. trachomatis</i>	FAM	gen ORF2
<i>N. gonorrhoeae</i>	ROX	genes <i>porA</i> y <i>opa</i>
Control de Extracción (CE)	HEX, VIC o JOE *	-

Tabla A4. 2. Diana, canal y genes.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A4.2 Reactivos suministrados

VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A4.3.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	4 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>N. gonorrhoeae</i> + <i>C. trachomatis</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	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

Tabla A4. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CTN196TE.

A4.3 Procedimiento del test

A4.3.1 Control de extracción liofilizado

Se recomienda abrir y manipular el Control de Extracción (CE) en el área pre-PCR del laboratorio, alejada del control positivo liofilizado. Reconstituir el Control de Extracción liofilizado (vial verde) añadiendo 500 µL del Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el Control de Extracción a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: Se debe utilizar en primer lugar el vial de Agua libre de RNAsa/DNAsa para reconstituir el Control de Extracción liofilizado en el área pre-PCR del laboratorio, y después se debe usar para reconstituir el *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A4.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* 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 *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 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.

A4.3.3 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

A4.3.4 Protocolo PCR

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

Añadir 15 µL de *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de Negative Control (vial morado) en los pocillos reservados para el control negativo.

Añadir 5 µL de la muestra de DNA en los diferentes pocillos.

Añadir 5 µL de *N. gonorrhoeae* + *C. trachomatis* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

Si el CE se utiliza sólo como control de la inhibición de la PCR, añadir 1 µL del CE (vial verde) a los pocillos en los que se encuentre la muestra.

Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.

3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

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

Ciclos	Etapas	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 A4. 4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*C. trachomatis*), ROX (*N. gonorrhoeae*) y HEX, JOE o VIC (Control de Extracción (CE)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

Bibliography/Bibliografía

1. Kirkcaldy, R. D., Weston, E., Segurado, A. C., & Hughes, G. (2019). Epidemiology of gonorrhoea: A global perspective. *Sexual Health*, 16, 401–411. <https://doi.org/10.1071/SH19061>
2. Mohseni, M., Sung, S., & Takov, V. (2021). Chlamydia. [Updated 2021 Aug 11]. In *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537286/?report=classic>
3. Unemo, M., Seifert, H. S., Hook, E. W., Hawkes, S., Ndowa, F., & Dillon, J. A. R. (2019). Gonorrhoea. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0128-6>
4. World Health Organization. (2016a). *WHO GUIDELINES FOR THE Treatment of Chlamydia trachomatis*.
5. World Health Organization. (2016b). *WHO GUIDELINES FOR THE Treatment of Neisseria gonorrhoeae*.

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

	In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico in vitro		Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante		Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura		Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test		Unique Device Identification Identificación única de dispositivo		Catalogue number Número de referencia

Trademarks

Modification rights reserved. All rights reserved. © CerTest Biotec, S.L.

All other trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

Control de Cambios / Change Control		
Versión / Version nº	Cambios / Changes	Fecha / Date
00	Versión Original / Original Version	13/12/2021
01	Se añaden muestras orofaríngeas/ Inclusion of oropharyngeal samples	08/04/2022

Table A 5. Tabla de Control de Cambios / Control change table.

Revision: 08th April 2021.

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

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

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead



F-566 rev01