

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



Sexual Health panel I

CE IVD
0318*

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

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

OPEN FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 1) / OPEN FORMAT CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 1)

| PRODUCT / PRODUCTO | REFERENCE / REFERENCIAS |
|--|-------------------------|
| VIASURE Sexual Health Panel / Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile | VS-SP0112L |
| VIASURE Sexual Health Panel / Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile | VS-SP0112H |
| VIASURE Sexual Health Panel / Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile | VS-SP0113L |
| VIASURE Sexual Health Panel / Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile | VS-SP0113H |

Table A 1. References for Open format with internal control products. / *Referencias para productos Open Format con control interno.*

OPEN FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL (SEE ANNEX 2) / OPEN FORMAT CON CONTROL DE EXTRACCIÓN (VER ANEXO 2)

| PRODUCT / PRODUCTO | REFERENCE / REFERENCIAS |
|--|-------------------------|
| VIASURE Sexual Health Panel / Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile | VS-SP0112LE |
| VIASURE Sexual Health Panel / Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile | VS-SP0112HE |
| VIASURE Sexual Health Panel / Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile | VS-SP0113LE |
| VIASURE Sexual Health Panel / Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile | VS-SP0113HE |

Table A 2. References for Open format with extraction control products. / *Referencias para productos Open Format con control de extracción.*

NOTE: Instructions For Use (IFU) are included into the kit in English/Spanish version / *Las instrucciones de uso (IFU) se incluyen en el kit en versión inglés/español.*

Note: The user should notify the manufacturer and the competent authority of the Member State in which he is established as a user and/or patient of any serious incident related to the product.

Nota: El usuario debe notificar al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido como usuario y/o paciente cualquier incidencia grave relacionada con el producto.

Content

| | | |
|-----------|---|----|
| 1. | Intended purpose | 6 |
| 2. | Summary and Explanation | 6 |
| 3. | Principle of the procedure | 8 |
| 4. | Reagents provided | 9 |
| 5. | Reagents and equipment to be supplied by the user | 9 |
| 6. | Transport and storage conditions..... | 10 |
| 7. | Precautions for users | 11 |
| 8. | Test procedure | 12 |
| 8.1. | Specimen collection, transport and storage | 12 |
| 8.2. | DNA extraction..... | 13 |
| 9. | Result interpretation | 14 |
| 9.1. | References with internal control (references in Annex 1)..... | 14 |
| 9.2. | References with extraction control (references in Annex 2)..... | 17 |
| 10. | Limitations of the test | 20 |
| 11. | Quality control..... | 21 |
| 12. | Analytical performance characteristics | 21 |
| 12.1. | Analytical linearity and Analytical sensitivity (Limit of Detection (LoD))..... | 21 |
| 12.2. | Accuracy | 22 |
| 12.2.1. | Trueness (Veracity) | 22 |
| 12.2.2. | Precision..... | 23 |
| 12.3. | Analytical specificity and reactivity | 23 |
| 12.3.1. | Analytical Specificity | 23 |
| 12.3.1.1. | Cross-reactivity and exclusivity assay | 23 |
| 12.3.1. | Analytical reactivity..... | 25 |
| 12.4. | Metrological traceability | 26 |
| 13. | Clinical performance characteristics..... | 26 |
| | ANNEX 1 | 30 |
| A1.1 | Principle of the procedure..... | 30 |
| A1.2 | Reagents provided..... | 31 |
| A1.3 | Test procedure | 32 |
| A1.3.1 | Lyophilized positive control..... | 32 |
| A1.3.2 | PCR protocol..... | 32 |

| | |
|---|----|
| ANNEX 2 | 33 |
| A2.1 Principle of the procedure..... | 33 |
| A2.2 Reagents provided..... | 34 |
| A2.3 Test procedure..... | 35 |
| A2.3.1 Lyophilized extraction control | 35 |
| A2.3.2 Lyophilized positive control..... | 35 |
| A2.3.3 PCR protocol..... | 35 |

Contenido

| | |
|---|----|
| 1. Uso previsto..... | 37 |
| 2. Introducción y explicación | 37 |
| 3. Procedimiento | 40 |
| 4. Reactivos suministrados..... | 40 |
| 5. Reactivos y equipos a suministrar por el usuario..... | 40 |
| 6. Condiciones de transporte y almacenamiento..... | 41 |
| 7. Precauciones para el usuario | 42 |
| 8. Procedimiento del test | 44 |
| 8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras | 44 |
| 8.2. Extracción de DNA | 45 |
| 9. Interpretación de resultados..... | 46 |
| 9.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexo 1) | 46 |
| 9.2. Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexo 2)..... | 49 |
| 10. Limitaciones del test | 52 |
| 11. Control de calidad | 53 |
| 12. Características del funcionamiento analítico | 54 |
| 12.1. Linealidad analítica y Sensibilidad analítica (Límite de Detección (LoD)) | 54 |
| 12.2. Exactitud..... | 54 |
| 12.2.1. Veracidad (Sesgo)..... | 54 |
| 12.2.2. Precisión | 55 |
| 12.3. Especificidad y reactividad analítica | 55 |
| 12.3.1. Especificidad analítica | 56 |
| 12.3.1.1. Reactividad cruzada y ensayo de exclusividad | 56 |
| 12.3.1. Reactividad analítica | 57 |

| | | |
|--------|--|----|
| 12.4. | Trazabilidad metrológica..... | 58 |
| 13. | Características del funcionamiento clínico | 58 |
| | ANEXO 1 | 63 |
| A1.1 | Procedimiento | 63 |
| A1.2 | Reactivos suministrados | 64 |
| A1.3 | Procedimiento del test | 65 |
| A1.3.1 | Control positivo liofilizado | 65 |
| A1.3.2 | Protocolo PCR | 65 |
| | ANEXO 2..... | 67 |
| A2.1 | Procedimiento | 67 |
| A2.2 | Reactivos suministrados | 68 |
| A2.3 | Procedimiento del test | 69 |
| A2.3.1 | Control de extracción liofilizado | 69 |
| A2.3.2 | Control positivo liofilizado | 69 |
| A2.3.3 | Protocolo PCR | 69 |
| | Bibliography/Bibliografía | 71 |
| | Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i> | 73 |
| | Trademarks..... | 73 |

ENGLISH

1. Intended purpose

VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific identification and differentiation of DNA of *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*; Herpes virus 1, Herpes virus 2, *Treponema pallidum*; *Candida albicans*, and/or *Gardnerella vaginalis* in genital tract specimens and urine samples from patients with signs and symptoms of sexually transmitted diseases (STDs). This test is intended for use as an aid in the diagnosis of STDs in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from clinical specimens, multiplied using Real Time amplification and detected using specific primers and a fluorescent reporter dye probe for *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum* and *M. hominis*; HSV-1, HSV-2 and *T. pallidum*; *C. albicans*, and *G. vaginalis*.

2. Summary and Explanation

Sexually transmitted infections (STIs) represent a group of diseases that affect the sexual and reproductive health of millions of people, being a public problem of interest (Rodríguez-Granger et al., 2020). Etiological agents responsible for STIs include fungi, bacteria, parasites and viruses (Sharifi-Rad et al., 2021). Some of these microorganisms are eliminated after a period of time, while others are recurrent and some remain in the body asymptotically, allowing the progress of the disease and generating consequences such as inflammations of the genito-urinary tract, infertility and even the development of cancer (Sharifi-Rad et al., 2021; World Health Organization, 2022).

N. gonorrhoeae is a bacterium (gonococcus) mainly known worldwide as the aetiological agent of gonorrhoea (Kirkcaldy et al., 2019; Młynarczyk-Bonikowska et al., 2020; Unemo et al., 2019). *N. gonorrhoeae* generally causes mucosal infections of the urogenital tract (Kirkcaldy et al., 2019; Unemo et al., 2019), predominantly infecting columnar and transitional epithelia, although it can also attach to the stratified squamous epithelium of the ectocervix (Unemo et al., 2019). Such *N. gonorrhoeae* infections most frequently result in cervicitis in women and urethritis in both sexes (Springer & Salen, 2023; Unemo et al., 2019). Most of males with gonococcal urethritis are symptomatic, but substantially fewer women with urogenital gonorrhoea are symptomatic and, when present, symptoms are nonspecific (Unemo et al., 2019). 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 (CDC, 2021a; Kirkcaldy et al., 2019; Springer & Salen, 2023; Unemo et al., 2019).

C. trachomatis is a gram-negative bacterium, part of the *chlamydophila* genus, responsible of the sexually transmitted infectious (STI) disease called Chlamydia (Mohseni M et al., 2023). In the USA, it is the most reported bacterial infection, and globally, it is the most common prevalent STI (Huai et al., 2020; Mohseni M et al., 2023). 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" (Mohseni M et al., 2023), which is the leading infectious cause of blindness worldwide (Mohseni M et al., 2023; World Health Organization, 2016). 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 (Mohseni M et al., 2023; World Health Organization, 2016).

Trichomonas vaginalis infection is one of the most common non-viral sexually transmitted diseases (STDs) in the world (Korich et al., 2020; Muzny et al., 2020; Van Gerwen & Muzny, 2019). The World Health Organization (WHO) estimated 156 million cases of *T. vaginalis* infection worldwide in 2016, accounting for almost half of the global STI incidence that year (Muzny et al., 2020; Van Gerwen & Muzny, 2019). *T. vaginalis* infection has been associated with vaginitis, cervicitis and urethritis, premature rupture of membranes and premature delivery in pregnant women (Muzny et al., 2020), however, 75-80% of cases are asymptomatic, with infections lasting for months to years (Korich et al., 2020). *T. vaginalis* infection has also been associated with an increased risk of HIV acquisition and transmission in women (Muzny et al., 2019).

Mycoplasma hominis colonizes the lower urogenital tract and is associated with urogenital infections, particularly bacterial vaginosis and non-gonococcal urethritis, but it is also involved in extra genital infections, such as postpartum or post-abortion fever, in post-cesarean wound infections or after a hysterectomy (Posse et al., 2018; Rufo et al., 2021; Romyantseva et al., 2019). In neonates, it can cause meningitis, brain abscesses and eye infections, and in adults, bacteremia, septic arthritis, osteitis, endocarditis, mediastinitis, brain abscesses and respiratory infections have been described (Posse et al., 2018).

M. genitalium is one of the smallest prokaryotes known to self-replicate, which has emerged over the last decades as a sexually transmitted pathogen (Gnanadurai & Fifer, 2020). When *M. genitalium* infects the host, it causes inflammation in the urogenital tract, leading to vaginal discharge, dysuria, or the potential development of Pelvic Inflammatory Disease (PID), cervicitis, preterm delivery, spontaneous abortion and possible infertility in women (CDC, 2021b; Jensen et al., 2022; Molenaar et al., 2018; Yu et al., 2023), as well as symptomatic and asymptomatic non-gonococcal urethritis (NGU), non-chlamydial non-gonococcal urethritis (NCNGU), dysuria and discharge in men (CDC, 2021b; Jensen et al., 2022).

U. urealyticum and *U. parvum* are opportunistic bacteria found in the human urogenital tract in both healthy individuals and symptomatic patients (Horner et al., 2018; Romyantseva et al., 2019). While *U. parvum* is more commonly implicated in clinical disease, *U. urealyticum* is more frequently found in urogenital infection (Sprong et al., 2020). These bacteria cause inflammation and lead to bacterial vaginosis, chorioamnionitis or infertility, among others (Rufo et al., 2021).

Candida is part of the normal flora in many women and is often asymptomatic, but under determined situations it could become pathogenic (Dadar et al., 2018; Jeanmonod & Jeanmonod, 2021; Willems et al., 2020). Vulvovaginal candidiasis (VVC) is the most prevalent human candida infection, estimated to affect approximately 70-75% of all women at some point of their lifetimes, and about 8% of women suffer Recurrent VVC (RVVC) globally (if occurs more than three episodes per year) (Denning et al., 2018; Jeanmonod & Jeanmonod, 2021; Willems et al., 2020). *C. albicans* is responsible of about the 90% of cases of the mentioned syndrome, being non-*albicans* *Candida* species, and in particular *C. glabrata*, the responsible of most of the remaining cases (Jeanmonod & Jeanmonod, 2021; Willems et al., 2020). However, it is important to highlight that detailed epidemiological data is not available for this disease process, owing to self-treatment (without diagnosis), inaccuracy of self-diagnosis, and overestimation of cases due to epidemiologic reports based on culture alone (as 10% of women are asymptomatic with positive candida cultures) (Jeanmonod & Jeanmonod, 2021; Willems et al., 2020).

Gardnerella vaginalis is a facultative Gram-variable anaerobic bacterium belonging to the family *Bifidobacteriaceae*, present in 95-100% of Bacterial Vaginosis (BV) cases, so it was originally thought to be the primary BV pathogen (Margolis & Fredricks, 2014; Muzny et al., 2019). However, *G. vaginalis* has been found in women with normal vaginal microbiota (with a prevalence as high as 70-85% in BV-negative women), suggesting that this microorganism may be part of the normal vaginal flora (Margolis & Fredricks, 2014; Muzny et al., 2019). BV is highly prevalent in women of reproductive age, affecting 8-23% of them, both in a symptomatic and asymptomatic BV (Margolis & Fredricks, 2014).

Human Herpes Simplex Virus (HSV) types 1 and 2 are two of the most prevalent human viruses worldwide, which are commonly associated to diseases such as cold sores, genital herpes, herpes stromal keratitis, meningitis, and encephalitis (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). HSV primarily affects the skin and mucus membranes, causing persistent infections consisting of periods of quiescence (latency) and recurrent disease (reactivation) (Cole, 2020; Minaya et al., 2017). Transmission of both HSV-1 and HSV-2 occurs through oral contact, while HSV-2 infections occur later, normally through sexual transmission, and the clinical manifestations of these viruses are highly variable: asymptomatic, mild or life-threatening (Cole, 2020; WHO, 2023; Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). In most immunocompetent individuals, HSV causes mild and self-resolving disease (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). However, HSV infection is also associated with high morbidity and mortality in certain individuals, like immunocompromised patients who suffer recurrent HSV infection (Cole, 2020; Zhu & Viejo-Borbolla, 2021).

The spirochete *Treponema pallidum* and other pathogenic treponemes cause venereal syphilis, yaws, endemic syphilis, and pinta, all of them multistage infections that, despite their similarities, can be differentiated through clinical, epidemiologic and geographic criteria (Radolf et al., 2016; Tudor et al., 2022). However, *T. pallidum* subsp. *pallidum* is the only treponema subspecies associated to venereal disease (Tudor et al., 2022). The pathogenic treponemes are uncultivable, slow-growing microorganisms with identical flat-wave morphologies, which poorly tolerate desiccation, elevated temperature, and ambient oxygen tension; traits that explain why efficient transmission requires close personal contact (Radolf et al., 2016).

Conventional diagnostic procedures require isolation and cultivation of the infective agent from clinical specimens, being time-consuming. Nucleic acid amplification tests, as real time PCR, allow to overcome some of these limitations.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit is designed for the simultaneous qualitative detection of DNA from *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*; Herpes virus 1, Herpes virus 2, *Treponema pallidum*; *Candida albicans*, and/or *Gardnerella vaginalis* in genital tract specimens and urine samples. After DNA isolation, the identification of these microorganisms is performed by the amplification of a conserved region of specific genes using specific primers and a fluorescent-labelled probes (See Table A1 2. and A2 2 in Annex 1 and 2, respectively).

VIASURE *Sexual Health Panel I* 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 the target template. This fluorescence could be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *Sexual Health Panel I* 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 or extraction control** to verify the correct functioning of the amplification mix.

The internal control (IC) verifies if the amplification reaction works properly. If the PCR reaction is inhibited due to the presence of an artifact/inhibitor or because the well is incorrectly rehydrated this control may become negative.

The extraction control (EC) monitors the efficiency of the extraction method and verifies the PCR reaction. It is supplied in an additional vial and must be added to the samples before the extraction process.

4. Reagents provided

VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit includes the materials and reagents detailed in Annex 1 for open format with internal control products and Annex 2 for open 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 *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- 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.
- Blank sample (See section 8.2 DNA extraction).

VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit was tested on the following equipments: 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies), Cobas z480 Analyzer (Roche Molecular Diagnostics), Rotor-Gene® Q (Qiagen), DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology) and DTlite real-time PCR instrument (DNA-Technology).

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 PCR instrument (DNA-Technology): FAM channel -500*, HEX channel – 1000, ROX channel – 1000 and Cy5 channel - 1000.
- DTLite real-time PCR instrument (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 kit label.
- Avoid vibrations during transport to prevent liquid leakage.
- 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.
- For open format kits (strips and plates): For proper use of the kit, it is recommended not to rehydrate additional unused wells. If all provided in 8-well strips or 96-well plate are not used, the required number of reaction wells can be easily cut from 8-well strips or 96-well plates. If all wells are not used, it is recommended that unused wells be stored in the provided foil bags with the silica gel inside to prevent contact with light until use. The open bag with not rehydrated wells at 2-40°C is stable for up to 12 months.
- Keep components away from light.
- Once the required wells are rehydrated, the addition of nucleic acid and performance of the qPCR must be carried out immediately.

The following table summarises the conditions for transport, storage and use of the overall kit and each component:

| Component | Transport Conditions | Storage Conditions | In-use conditions |
|---|---|---|--|
| Entire VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit. | 2-40°C during the shelf life stated in the label. | Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. | * See <i>in-use conditions of each component</i> . |
| Sexual Health Panel I well-strip or well-plate (See Annex 1 and 2). | | Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. Non-rehydrated wells in an open pouch with the silica gel: 2-40°C for up to 12 months. | Room temperature. |
| Sexual Health Panel I Positive Control vial | | Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. Rehydrated control: -20°C during the shelf life stated in the kit label. | Immediate use at Room temperature. |
| Rehydration Buffer | | Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. Once opened: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. | Room temperature. |
| Negative Control vial | | Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. Once opened: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. | Room temperature. |
| Water RNase/DNase free vial | | Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. Once opened: 2-40°C during the shelf life stated in kit the label | Room temperature. |
| Extraction Control | | Before use: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. Once opened: 2-40°C during the shelf life stated in the kit label. | Immediate use at Room temperature. |

Table 1. Summary of the conditions for transport, storage and use of the VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit and each component.

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.
- Instructions for use must be read carefully before using the VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit. Do not perform the PCR assay until the information about procedures, safety precautions and limitations described in the Instructions for use have been understood.
- 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-SP0113LE and VS-SP0113HE). 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.
- Once the protective aluminium seal has been removed from the plates or strips, the end user must use the plates or strips in the shortest time possible to protect the master mix from sunlight.
- Please note: In case the number of reactions required/needed is less than supplied on one strip or plate, before removing the protective seal, carefully cut out the required wells and store the rest inside the bag with the desiccant.
- **Make sure to put the strip in the correct direction. The first well is marked with a hole on the top right corner. Be careful not to invert the strip throughout PCR process.**
- 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.
- Once the pouch of Positive Control or Extraction Control has been opened, rehydrate the vials immediately, use them in the PCR reaction or store them properly. It is not recommended to leave the vial open without resuspending, as this may cause deterioration of the reagent.
- Once the protective aluminium seal has been removed from the plate or strips, use them immediately for the qPCR (rehydrate the wells, add the samples, and place the strips/plate into the thermocycler). It is not recommended to leave the strips or plate open without resuspending. Likewise, once the required wells are rehydrated, the addition of nucleic acid and performance of the qPCR must be carried out immediately.
- 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 *Sexual Health Panel I* 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. Material Safety Data Sheet are not included with this device, nevertheless it could be consulted upon request to CerTest Biotec.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.
- Make sure that the configuration and conditions of the settings on the thermocycler is done following the instructions in the section 'PCR protocol' of Annexes 1 and 2 (DNA/RNA protocol, number of cycles, temperatures etc.).
- The certificate of analysis is not included with the device; however, it could be requested to Certest Biotec in case of need.

8. Test procedure

Please see Annex 1 for Open format with internal control products Test Procedure and Annex 2 for Open format with extraction control products Test Procedure.

8.1. Specimen collection, transport and storage

The VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit was tested in urine samples and genital tract swab specimens collected in lysis buffer or PreservCyt™ transport medium (PreservCyt™ Solution, HOLOGIC®). Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage and transport specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, clinical samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type) and processed as soon as possible to guarantee the quality of the

test. The specimens should be transported at 2 to 8°C for up to 24 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 24 hours), we recommend shipping at -20°C or lower¹. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 2 to 8°C for up to 24 hours, or frozen at -20°C or ideally at -80°C for conservation. However, if specimens are collected in PreservCyt™ Solution, they should be conserved at 15°C-30°C for up to 6 weeks². 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 and/or microbiology laboratory policy manuals. As example, refer to 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)*.

Please note: Specimen collection, transport, and storage conditions indicated above are suggested based on the recommendations for genital tract samples and urine samples intended to be used for nucleic acid detection, as appear in the referenced SEIMC recommendations report for general collection and transport procedures in clinical microbiology, and in the ThinPrep™'s Instructions for Use. Nevertheless, we recommend following laboratory guidelines, and/or microbiology laboratory policy manuals for proper transport and preservation of samples.

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 Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit is also available with Extraction Control (references include in Annex 2), if the Extraction Control (EC) is used to monitor nucleic acid isolation and as PCR inhibition control, add 5 µL of the reconstituted EC to the specimen and/or lysis buffer mixture. 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 per well/reaction.

Please note: Positive and Negative control must not be extracted. However, to monitor or control the extraction process and discard possible contaminations, a blank sample (not provided in the kit) could be extracted following the same procedure used for clinical samples. Blank sample should consist of the same matrix (real or simulated) as clinical samples, previously characterized as negative for all targets.

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:

¹ 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)*.

² https://www.hologic.com/sites/default/files/2022-05/AW-22719-002_001_02.pdf.

- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- ZP02006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit, using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).
- US121 NX-48 Urine/Swab DNA Kit using the Nexttractor® NX-48 (Genolution Inc.).
- MagDEA® Dx SV Kit, using magLEAD® 6gC or 12gC (Precision System Science).
- NucleoSpin® RNA Virus (MACHEREY-NAGEL).
- NucleoMag® Pathogen (MACHEREY-NAGEL).
- STARMag 96x4 Universal Cartridge Kit (Seegene), using the Microlab STAR Let automatic extraction system (Hamilton).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).
- MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit using the KingFisher Flex System instrument (ThermoFisher).
- Qiagen Symphony Sample Preparation module with the Qiagen Symphony Virus Mini Kit (Qiagen).

9. Result interpretation

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

All the result 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. The threshold must be established in each run. Please, if your equipment sets the threshold automatically, check and verify that it adjusts to the positive control or adjust it manually. For each channel, select the well corresponding the positive control, and fix the threshold within the exponential phase of the fluorescence curve and above any background signal (below the baseline). Once the threshold has been established, the rest of the samples of the same run can be interpreted.

The threshold value of the different channels could be different due to the chemical nature of the different fluorophores. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

It is also recommended to include a blank, consisting of a confirmed negative sample (the same matrix as tested samples) for the targets detected in order to set the baseline of the assay.

The use of positive and negative controls in each run validates the reaction by checking the absence of signal in the negative control wells and the presence of signal for *Sexual Health Panel I* in the positive control wells.

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

| Controls | Targets detected ¹ | Internal Control ² | Interpretation of Controls |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Positive Control (PC) | ≤40 | ≤40 | Valid |
| Negative Control (NC) | >40 or no signal | ≤40 | Valid |

Table 2. Expected Performance of Controls. Ct values. no signal = no amplification curves.

1. In cases where one or more controls fail (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 ($Ct \leq 40$) in control wells (PC and NC).

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.

In case that all target genes were negative, IC must show an amplification signal with $Ct \leq 35$. 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 by 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.

A sample is considered positive if the Ct value obtained is ≤ 40 and the Internal Control (IC) shows or not an amplification signal ($Ct \leq 40$ 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. In case of one of the targets presents a high number of copies, the rest of targets remain negative, and the Internal Control does not show amplification signal, false negatives of other targets cannot be discarded. It is recommended to repeat the qPCR diluting the DNA sample 1:10.

For interpretation of patient sample results, **select only the channels where targets are detected**. Then, use the following table, read and analyze the results:

| | Reaction Mix | Pathogens | Channels | | | |
|---|--------------|-----------------------|----------|-------------------|----------|-------------------|
| | | | FAM | HEX | ROX | Cy5 |
| 1 | NMT | <i>C. trachomatis</i> | Positive | | | |
| | | <i>M. genitalium</i> | | Positive | | |
| | | <i>N. gonorrhoeae</i> | | | Positive | |
| | | Internal Control (IC) | | | | Positive/Negative |
| 2 | URE | <i>T. vaginalis</i> * | Positive | | | |
| | | <i>U. urealyticum</i> | | Positive | | |
| | | <i>U. parvum</i> | | | Positive | |
| | | <i>M. hominis</i> | | | | Positive |
| 3 | HHT | HSV-1 | Positive | | | |
| | | Internal Control (IC) | | Positive/Negative | | |
| | | HSV-2 | | | Positive | |
| | | <i>T. pallidum</i> | | | | Positive |
| 4 | CGT | <i>T. vaginalis</i> * | Positive | | | |
| | | Internal Control (IC) | | Positive/Negative | | |
| | | <i>C. albicans</i> | | | Positive | |
| | | <i>G. vaginalis</i> | | | | Positive |

Table 3. Interpretation of patient sample results. Positive: Amplification curve. Empty: No amplification curve.

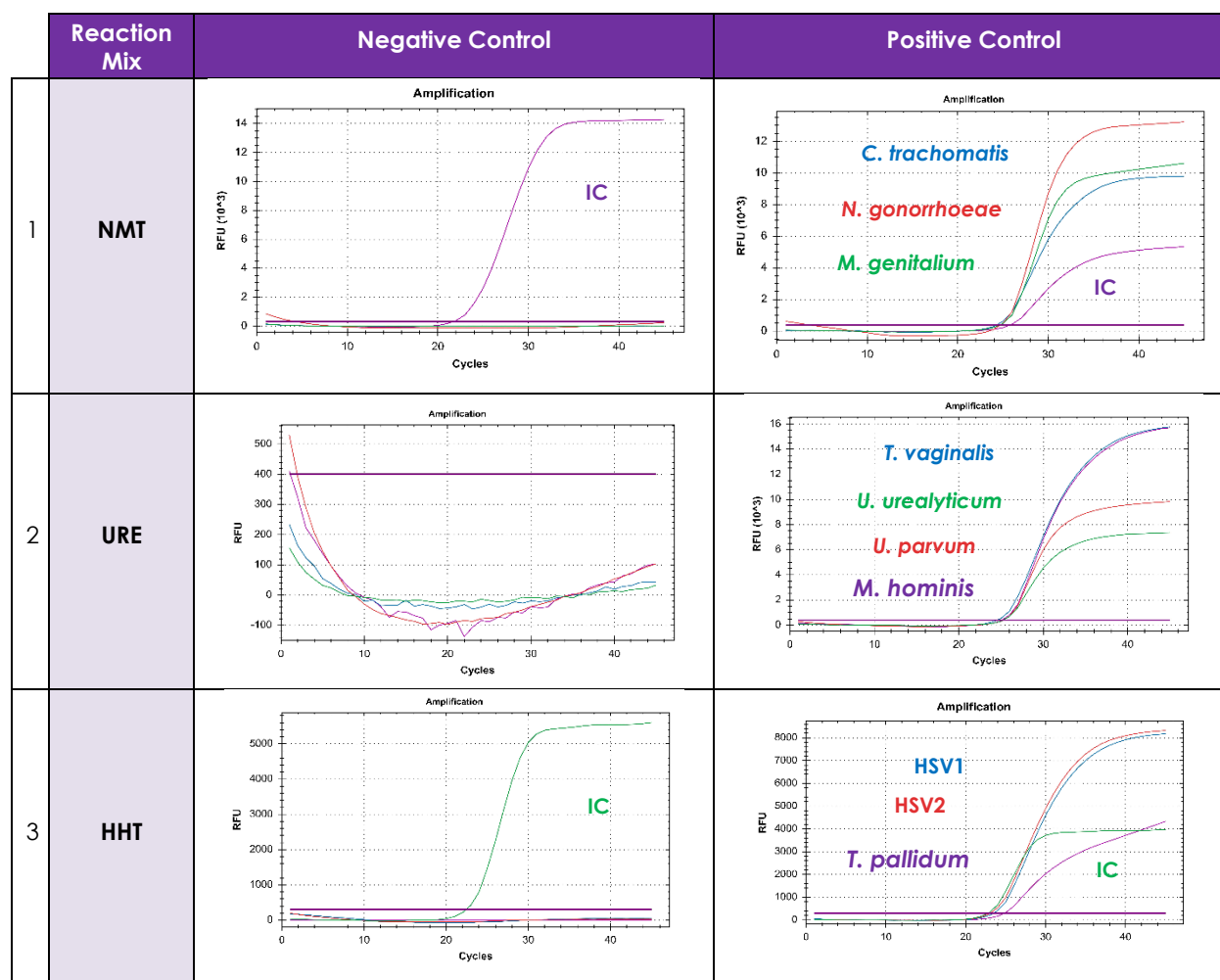
* Any patient sample displaying an amplification curve for *Trichomonas vaginalis* with URE and/or CGT reaction mixes should be considered as positive for *Trichomonas vaginalis*.

Note: One individual patient sample may be simultaneously positive for more than one target. Table 3 shows only the most representative results that may be expected with the VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit.

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.

NOTE: A positive test result for *C. albicans* and/or *G. vaginalis*, as well as for *M. hominis*, *U. parvum* and/or *U. urealyticum* does not necessarily indicate urogenital infections, since *C. albicans* and *G. vaginalis* can be part of the vaginal microbiota in healthy women, while *M. hominis*, *U. parvum* and *U. urealyticum* can be found in the human urogenital tract in healthy individuals. The results of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.



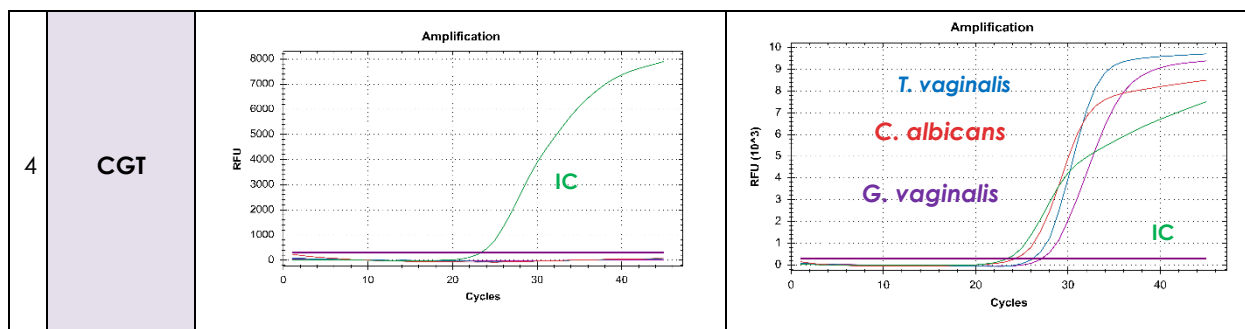


Table 4. Correct run of negative and positive controls run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

9.2. References with extraction control (references in Annex 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 Extraction Control ((EC) (1NMT reaction mix)) and Internal Control (IC) signal to verify the extraction procedure (EC) and 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. The threshold must be established in each run. Please, if your equipment sets the threshold automatically, check and verify that it adjusts to the positive control or adjust it manually. For each channel, select the well corresponding the positive control, and fix the threshold within the exponential phase of the fluorescence curve and above any background signal (below the baseline). Once the threshold has been established, the rest of the samples of the same run can be interpreted.

The threshold value of the different channels could be different due to the chemical nature of the different fluorophores. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

It is also recommended to include a blank, consisting of a confirmed negative sample (the same matrix as tested samples) for the targets detected in order to set the baseline of the assay.

The use of positive and negative controls in each run validates the reaction by checking the absence of signal in the negative control wells and the presence of signal for *Sexual Health Panel I* in the positive control wells.

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

| Controls | Targets detected ¹ | Extraction/Internal Control ² | Interpretation of Controls |
|------------------------------|-------------------------------|--|----------------------------|
| Positive Control (PC) | ≤40 | ≤40 | Valid |
| Negative Control (NC) | >40 or no signal | ≤40 | Valid |

Table 5. Expected Performance of Controls. Ct values. no signal = no amplification curves.

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/Internal Control (EC/IC) should show an amplification signal (Ct ≤40) in control wells (PC and NC). 1 µL of EC must be added to PC and NC of 1NMT prior to start qPCR (see section "PCR protocol" of Annex 2).

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.

In case that all target genes of the different pathogens results are negative, EC/IC must show an amplification signal with Ct \leq 35. If there is an absence of signal or Ct value $>$ 35 of the Extraction/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.

A sample is considered positive if the Ct value obtained is \leq 40 and the Extraction/Internal Control (EC/IC) shows or not an amplification signal (Ct \leq 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. In case one of the targets presents a high number of copies, the rest of targets remain negative, and the Extraction/Internal Control do not show amplification signal, false negatives of other targets cannot be discarded. It is recommended to repeat the qPCR diluting the DNA sample 1:10.

For interpretation of patient sample results, **select only the channels where targets are detected**. Then, use the following table, read and analyze the results:

| | Reaction Mix | Pathogens | Channels | | | |
|---|--------------|-------------------------|----------|-------------------|----------|-------------------|
| | | | FAM | HEX | ROX | Cy5 |
| 1 | 1NMT | <i>C. trachomatis</i> | Positive | | | |
| | | <i>M. genitalium</i> | | Positive | | |
| | | <i>N. gonorrhoeae</i> | | | Positive | |
| | | Extraction Control (EC) | | | | Positive/Negative |
| 2 | URE | <i>T. vaginalis</i> * | Positive | | | |
| | | <i>U. urealyticum</i> | | Positive | | |
| | | <i>U. parvum</i> | | | Positive | |
| | | <i>M. hominis</i> | | | | Positive |
| 3 | HHT | HSV-1 | Positive | | | |
| | | Internal Control (IC) | | Positive/Negative | | |
| | | HSV-2 | | | Positive | |
| | | <i>T. pallidum</i> | | | | Positive |
| 4 | CGT | <i>T. vaginalis</i> * | Positive | | | |
| | | Internal Control (IC) | | Positive/Negative | | |
| | | <i>C. albicans</i> | | | Positive | |
| | | <i>G. vaginalis</i> | | | | Positive |

Table 6. Interpretation of patient sample results. Positive: Amplification curve. Empty: No amplification curve.

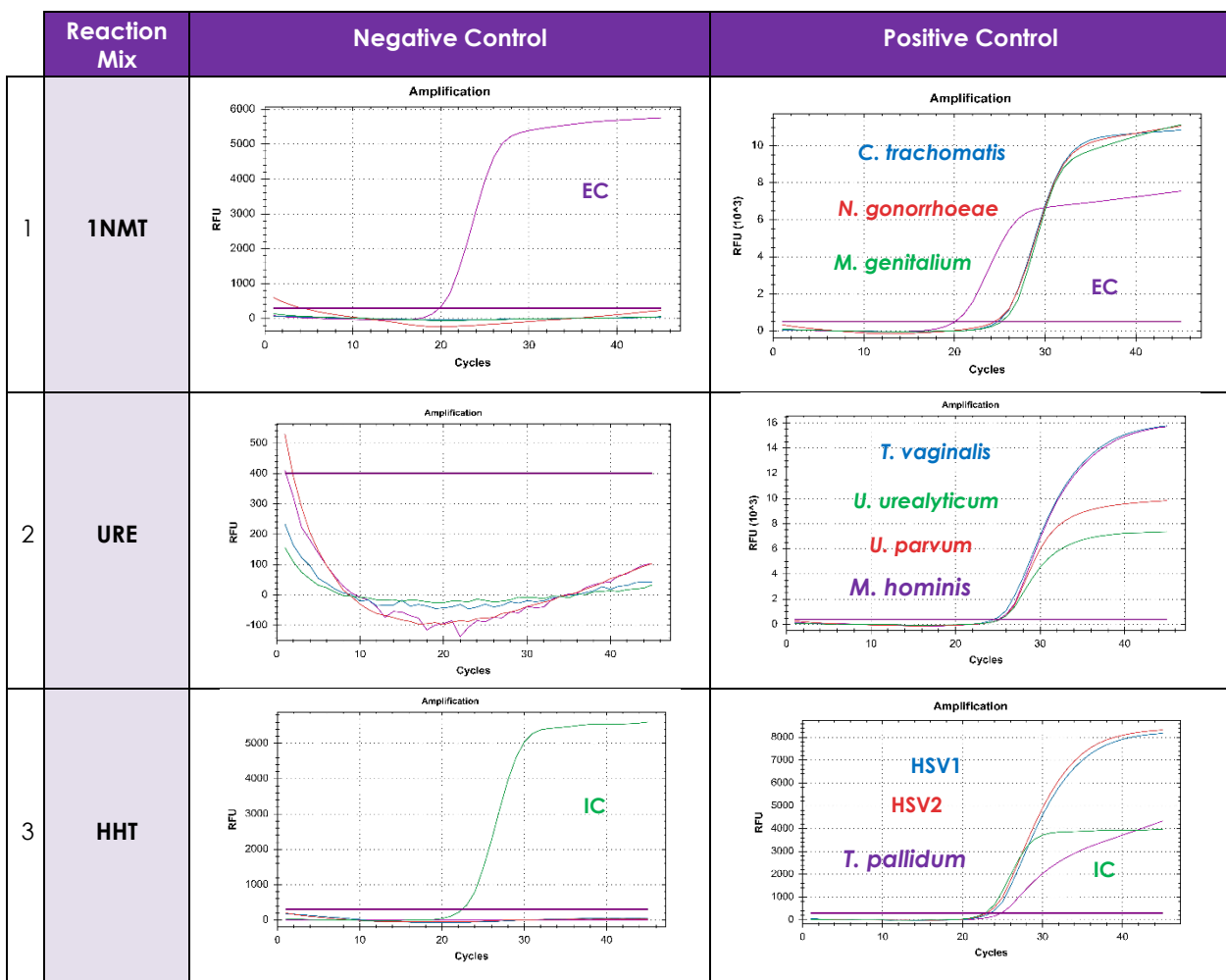
* Any patient sample displaying an amplification curve for *Trichomonas vaginalis* with URE and/or CGT reaction mixes should be considered as positive for *Trichomonas vaginalis*.

Note: One individual patient sample may be simultaneously positive for more than one target. Table 6 shows only the most representative results that may be expected with the VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit.

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.

NOTE: A positive test result for *C. albicans* and/or *G. vaginalis*, as well as for *M. hominis*, *U. parvum* and/or *U. urealyticum* does not necessarily indicate urogenital infections, since *C. albicans* and *G. vaginalis* can be part of the vaginal microbiota in healthy women, while *M. hominis*, *U. parvum* and *U. urealyticum* can be found in the human urogenital tract in healthy individuals. The results of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.



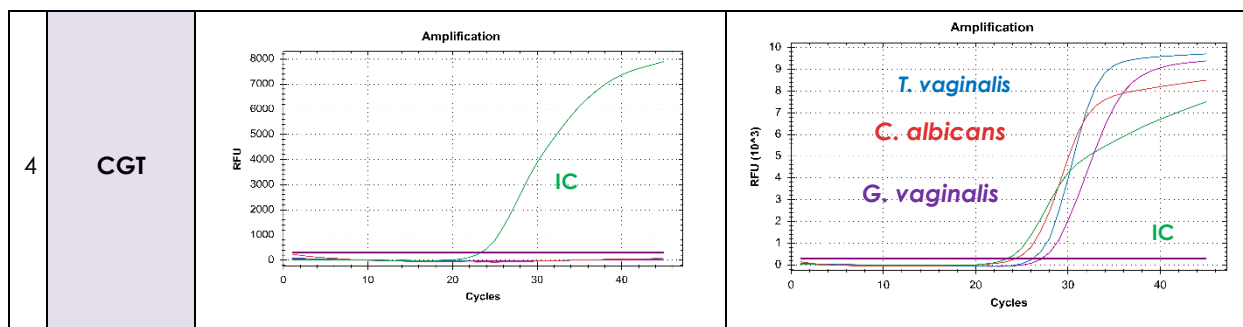


Table 7. Correct run of negative and positive controls run on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests. A positive test result for *C. albicans* and/or *G. vaginalis*, as well as for *M. hominis*, *U. parvum* and/or *U. urealyticum* does not necessarily indicate urogenital infections, since *C. albicans* and *G. vaginalis* can be part of the vaginal microbiota in healthy women, while *M. hominis*, *U. parvum* and *U. urealyticum* can be found in the human urogenital tract in healthy individuals.
- Although this assay can be used with other types of samples, it has been validated only with DNA extracted from genital tract specimens and urine 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 urine samples and genital tract specimens. The detection of *Chlamydia trachomatis* in pharyngeal, serum and rectal samples are out of the scope of certification by ON 0318. The rest of the pathogens have self-certification for CE marking.
- Possible crosstalk might be observed in empty channels of the thermocycler if there is no target to be detected, so it is required to select only the channels where these are amplified when interpretation of results is performed. Please contact to viasuresupport@certest.es for any queries.
- 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. It is not possible to correlate the Ct values obtained by PCR with the concentration of the sample as they depend on the thermocycler used and the run itself.
- 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*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis*, HSV-1, HSV-2, *T. pallidum*, *C. albicans*, and/or *G. vaginalis*, 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 Sexual Health Panel I 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 pathogen DNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis*, HSV-1, HSV-2, *T. pallidum*, *C. albicans*, and/or *G. vaginalis* varieties.
 - A pathogen 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 the infection 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 microorganisms and does not imply that these microorganisms are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of targets sequences.
 - Negative results do not preclude infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions. Optimum specimen types and timing for peak levels during infections caused by *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis*, HSV-1, HSV-2, *T. pallidum*, *C. albicans*, and/or *G. vaginalis* have not been determined. The collection of multiple specimens (types and time points) from the same patient may be necessary to detect the microorganism(s).
 - If diagnostic tests for other Sexually Transmitted Diseases (STD) are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis*, HSV-1, HSV-2, *T. pallidum*, *C. albicans*, and/or *G. vaginalis* infection/s is/are possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
 - Positive control and Negative control must not be extracted, but a blank sample is recommended to be included throughout the extraction and qPCR workflow to discard possible contaminations. Potential false positive results might remain undetected if blank sample is omitted.
 - Fluorescence values may vary due to multiple factors such as: PCR equipment (even being the same model), extraction system, type of sample, previous treatment of the sample, etc... among others.

11. Quality control

VIASURE *Sexual Health Panel I* 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 Extraction control (EC) confirms the correct performance of the technique.

12. Analytical performance characteristics

12.1. Analytical linearity and Analytical sensitivity (Limit of Detection (LoD))

The linearity of the assays was determined by testing a series of ten-fold dilutions containing a known concentration (ranging from 10^7 to 10^1 copies per reaction) of specific and synthetic DNA belonging to each target microorganism detected, on the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Besides, using the CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit showed a detection limit of 10 DNA copies per reaction for *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum* and *M. hominis*; HSV-1, HSV-2 and *T. pallidum*; *C. albicans* and *G. vaginalis*.

12.2. Accuracy

12.2.1. Trueness (Veracity)

The veracity of VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit was evaluated by testing the reference material listed below.

1. The International Reagent Resource (IRR™)

| External Reference | Pathogen Name | Variety |
|--------------------|---|-----------|
| FR-309 | Human Herpesvirus 1, Strain HF (ATCC® VR-260™) | HF |
| FR-310 | Human Herpesvirus 1, Strain KOS (ATCC® VR-1493™) | KOS |
| FR-311 | Human Herpesvirus 1, Strain MacIntyre (ATCC® VR-539™) | MacIntyre |

Table 8. Human Herpesvirus 1 reference strains from IRR.

2. The American Type Culture Collection (“ATCC®”):

| External Reference | Pathogen Name | Variety |
|--------------------|--|---|
| VR-571B | <i>Chlamydia trachomatis</i> | Trachoma type A strain HAR-13 [strain Har 13] |
| VR-573 | <i>Chlamydia trachomatis</i> | Trachoma type B strain HAR-36 |
| VR-347 | <i>Chlamydia trachomatis</i> | Apache-2 |
| VR-1477 | <i>Chlamydia trachomatis</i> | TW-3 [Trachoma type C strain TW-3] |
| VR-885 | <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar D | Trachoma type D strain UW-3/Cx |
| VR-348B | <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar E | BOUR |
| VR-346 | <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar F | IC-Cal-3 |
| VR-878 | <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar G | UW-57/Cx |
| VR-879 | <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar H | Trachoma type H strain UW-43/Cx |
| VR-880 | <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar I | UW-12/Ur |
| VR-886 | <i>Chlamydia trachomatis</i> | Trachoma type J strain UW-36/Cx |
| VR-887 | <i>Chlamydia trachomatis</i> | Trachoma type K strain UW-31/Cx |

Table 9. *C. trachomatis* reference strains from ATCC.

3. Spanish Type Culture Collection (CECT)

| External Reference | Pathogen Name | Variety |
|--------------------|-------------------------|----------|
| 1002 | <i>Candida albicans</i> | NCYC 597 |

Table 10. *C. albicans* reference strain from CECT.

4. Controls

| External Reference | Pathogen Name | Variety |
|--------------------|--|---------|
| MBC109 | AMPLIRUN® TREPONEMA PALLIDUM DNA CONTROL | - |

Table 11. *T. pallidum* reference material from Vircell S.L.

| External Reference | Pathogen Name | Variety |
|--------------------|---|---------|
| 0510006CFHI | Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid | MS |

| | | |
|------------|-------|-----------|
| NATMEP-BIO | HSV-1 | MacIntyre |
| NATMEP-BIO | HSV-2 | MS |

Table 12. HSV reference material from ZeptoMetrix Corporation.

5. EQA programmes

| Procedence | Pathogen Name | Variety |
|---|-------------------------------|-------------|
| QCMD 2017 Sexually Transmitted Infections I EQA Pilot Study | <i>Mycoplasma genitalium</i> | - |
| STI Evaluation Panel-01 | <i>Mycoplasma hominis</i> | - |
| STI Evaluation Panel-01 | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | - |
| QCMD 2017 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> DNA EQA Programme | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | St 49226 |
| QCMD 2017 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> DNA EQA Programme | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | Lvl Ng PorA |
| QCMD 2017 Sexually Transmitted Infections I EQA Pilot Study | <i>Trichomonas vaginalis</i> | - |
| STI Evaluation Panel-01 | <i>Ureaplasma urealyticum</i> | - |
| STI Evaluation Panel-01 | <i>Chlamydia trachomatis</i> | SW |
| QCMD 2017 <i>Chlamydia trachomatis</i> DNA EQA Programme | <i>Chlamydia trachomatis</i> | LGV |
| STI Evaluation Panel-01 | <i>Chlamydia trachomatis</i> | LGV |
| STI Evaluation Panel-01 | <i>Gardnerella vaginalis</i> | - |
| STI Evaluation Panel-01 | <i>Trichomonas vaginalis</i> | - |

Table 13. Reference material from EQA programmes.

12.2.2. Precision

To determine the precision of VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit, intra-assay (repeatability), inter-assay (reproducibility), inter-batch (intermediate precision) and inter-thermocycler (site-to-site) assays were performed for each reaction mix that makes up this VIASURE panel. After performing these assays, it was verified the conformity of each reaction mix with the criteria initially stated, so results could be extrapolated to VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit.

12.3. Analytical specificity and reactivity

The analytical specificity and reactivity were evaluated for the VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit *in silico* and using different starting material such as certified reference strains, certified reference RNA/DNAs and material from the EQAs programs.

12.3.1. Analytical Specificity

12.3.1.1. Cross-reactivity and exclusivity assay

Cross-reactivity: *in silico* analysis

The Analytical Specificity (Cross-reactivity) was assessed by using publicly available nucleotide sequence databases and search and/or alignment tools to verify that other genomes or microorganisms do not produce nonspecific amplification in the test. The bioinformatics analyses showed that the selected primers and probes should not cause false positives in detecting *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*,

Gardnerella vaginalis, *Candida albicans*, *Treponema pallidum*, Herpes virus 1 and Herpes virus 2 when other organisms are present.

Cross-reactivity: wet testing

The Analytical Specificity of the VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms associated to common enteric and genitourinary pathogens or flora present in the gastrointestinal tract or urogenital system. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested, except the targeted pathogens of each assay.

| Cross-reactivity testing | | | | | |
|--|-----|--|-----|--|-----|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> Strain NCTC 7844 | - | Echovirus Type 11 | - | <i>Mycoplasma genitalium</i> (drug resistant) | -/+ |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> Strain DSM 819 | - | <i>Enterobacter aerogenes</i> serotype Cloaca B | - | <i>Mycoplasma genitalium</i> (wild type) | -/+ |
| <i>Bacteroides fragilis</i> EN-2, VPI 2553 | - | <i>Enterobacter cloacae</i> serotype Cloaca A | - | <i>Mycoplasma genitalium</i> G37 | -/+ |
| <i>Candida albicans</i> Strain NCYC 597 | -/+ | <i>Enterococcus faecalis</i> Strain NCIMB 775 | - | <i>Mycoplasma genitalium</i> M6303 (macrolide resistant) | -/+ |
| <i>Candida dubliniensis</i> Strain NRRL Y- 17841 | - | <i>Enterococcus faecium</i> Serotype 11 | - | <i>Mycoplasma genitalium</i> M6593 (macrolide resistant) | -/+ |
| <i>Candida glabrata</i> Strain NRRL Y-65 | - | Enterovirus type 71 | - | <i>Mycoplasma hominis</i> | -/+ |
| <i>Candida krusei</i> | - | Enterovirus (Echovirus 7) | - | <i>Neisseria cinerea</i> | - |
| <i>Candida parapsilosis</i> | - | Enterovirus (Coxsackie A4) | - | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | -/+ |
| <i>Candida tropicalis</i> Strain 1 | - | <i>Escherichia coli</i> Strain O.1285; O18:H7:K1 | - | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> St 49226 | -/+ |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> (SW) | -/+ | <i>Gardnerella vaginalis</i> | -/+ | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Lvl Ng PorA | -/+ |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV) | -/+ | <i>Haemophilus ducreyi</i> class 1 | - | <i>Neisseria meningitidis</i> Serogroup A | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV2) | -/+ | <i>Haemophilus influenzae</i> Strain Minn A | - | Parechovirus types 1, 2 and 3 | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Trachoma type A strain HAR-13 [strain Har 13] | -/+ | Hepatitis A Virus | - | <i>Pneumocystis jirovecii</i> (g885652) | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Trachoma type B strain HAR-36 | -/+ | HSV-1 (clinical) | -/+ | <i>Pneumocystis jirovecii</i> (Type A1) | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Apache-2 | -/+ | HSV-1 Macintyre | -/+ | <i>Proteus mirabilis</i> Strain NCIMB 5887 | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> TW-3 [Trachoma type C strain TW-3] | -/+ | HSV-1 strain HF | -/+ | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Strain ATCC 27853 | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar D Trachoma type D strain UW-3/Cx | -/+ | HSV-1 strain KOS | -/+ | <i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> Strain NCTC 1377 | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar E BOUR | -/+ | HSV-1 (95/1906) | -/+ | <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Strain ATCC 25923 | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar F IC-Cal-3 | -/+ | HSV-2 (clinical) | -/+ | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Strain Diaz 552 | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar G UW-57/Cx | -/+ | HSV-2 MS | -/+ | <i>Streptococcus agalactiae</i> Strain Z019 | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar H Trachoma type H strain UW-43/Cx | -/+ | Human Papillomavirus types 16 and 18 | - | <i>Streptococcus pneumoniae</i> Strain Z022 | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar I UW-12/Ur | -/+ | <i>Klebsiella oxytoca</i> Strain CCUG 15717 | - | <i>Treponema phagedenis</i> | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Genovar F | -/+ | <i>Klebsiella pneumoniae</i> Serotype Capsular 2 | - | <i>Treponema pallidum</i> | -/+ |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Trachoma type J strain UW-36/Cx | -/+ | JC virus type 1A | - | <i>T. pallidum pertenue</i> (Brazzaville) | -/+ |

| | | | | | |
|--|-----|---|-----|--------------------------------|-----|
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar J | -/+ | <i>Listeria innocua</i> Serotype 6a | - | <i>Trichomonas vaginalis</i> | -/+ |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar K | -/+ | <i>Listeria ivanovii</i> Serovar 5 | - | <i>Ureaplasma parvum</i> | -/+ |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Trachoma type K strain UW-31/Cx | -/+ | <i>Listeria monocytogenes</i> Serotype 4b | - | <i>Ureaplasma urealyticum</i> | -/+ |
| Coxsackievirus Type B3 | - | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | - | Varicella-zoster virus (Ellen) | - |
| Cytomegalovirus AD-169 | - | <i>Mycoplasma genitalium</i> | -/+ | Varicella-zoster virus (9/84) | - |
| Cytomegalovirus (clinical) | - | | | | |

Table 14. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

Interferences and inhibitors of PCR

A study of interfering substances was performed to test the possible interfering effect of endogenous and exogenous substances on VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit. The results obtained lead to conclude that, at the concentrations tested, no interference of any the evaluated substances is observed at the concentrations indicated for each condition.

12.3.1. Analytical reactivity

Analytical Reactivity *in silico* assay

The Analytical Reactivity (Inclusivity) was assessed to check that the different mutations could be found do not affect the correct functionality of the tests or, in the event that they are affected, take corrective action. The bioinformatics analyses showed that the selected primers and probes correctly detect nucleic acid sequences of *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, *Treponema pallidum*, Herpes virus 1 and Herpes virus 2.

Analytical reactivity wet testing

The reactivity of VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit for **Sexually Transmitted Diseases Reaction mix** (NMT and URE) was evaluated against DNA extracted from: *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria gonorrhoeae* strains St 49226 and Lvl Ng PorA, *Chlamydia trachomatis* (SW, LGV and LGV2), *Chlamydia trachomatis* Genovar F, *Chlamydia trachomatis* Trachoma type A strain HAR-13 [strain Har 13], *Chlamydia trachomatis* Trachoma type B strain HAR-36, *Chlamydia trachomatis* Apache-2, *Chlamydia trachomatis* TW-3 [Trachoma type C strain TW-3], *Chlamydia trachomatis* Serovar D Trachoma type D strain UW-3/Cx, *Chlamydia trachomatis* Serovar E BOUR, *Chlamydia trachomatis* Serovar F IC-Cal-3, *Chlamydia trachomatis* Serovar G UW-57/Cx, *Chlamydia trachomatis* Serovar H Trachoma type H strain UW-43/Cx, *Chlamydia trachomatis* Serovar I UW-12/Ur, *Chlamydia trachomatis* Trachoma type J strain UW-36/Cx, *Chlamydia trachomatis* Serovar J, *Chlamydia trachomatis* Serovar K, *Chlamydia trachomatis* Trachoma type K strain UW-31/Cx, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma genitalium* (drug resistant), *Mycoplasma genitalium* (wild type), *Mycoplasma genitalium* G37, *Mycoplasma genitalium* M6303 and *Mycoplasma genitalium* M6593, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma hominis*, showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit for **Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Treponema pallidum reaction mix** was evaluated against DNA extracted from: HSV-1 (clinical), HSV-1 strain MacIntyre, HSV-1 strain HF, HSV-1 strain (95/1906) and HSV-1 strain KOS, HSV-2 (clinical), HSV-2 strain MS, *Treponema pallidum*, and *Treponema pallidum pertenu* (Brazzaville), showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit for **C. albicans, G. vaginalis & T. vaginalis reaction mix** was evaluated against DNA extracted from *Candida albicans* strain NCYC 597, *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis*, showing positive results.

12.4. Metrological traceability

This assay is not designed for measuring purposes.

13. Clinical performance characteristics

The clinical performance of VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit was tested using genital tract specimens and urine samples from patients with clinical signs and symptoms of STDs. In order to determine the clinical diagnostic accuracy, evaluations were conducted through collaboration with national and international entities. A summary of the sites, sample type and workflow is included in the following table:

| | Site | Sample type | Workflow | Master Mix Code | Target |
|---|---|--|--|-----------------|---|
| 1 | Certest Biotec, in collaboration with the Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB) and the Hospital Ernest Lluch (HEL) (Zaragoza, Spain) | Vaginal swabs Vagino/rectal swabs Urogenital/genital swabs Rectal/ anal swabs Urethral swabs | Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex); MagDEA Dx SV kit using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) | SP01 | <i>C. trachomatis</i> <i>M. genitalium</i> <i>N. gonorrhoeae</i> <i>U. urealyticum</i> <i>U. parvum</i> <i>M. hominis</i> <i>T. vaginalis</i> |
| | Certest Biotec Zaragoza, Spain), in collaboration with Cerba Xpert | | MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit, using the KingFisher Flex (Thermo Scientific) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) | | HSV-1 HSV-2 |
| 2 | Certest Biotec (Zaragoza, Spain) | Genital tract samples | Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex); MagDEA Dx SV kit using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.); MagPurix® Plant DNA Extraction Kit using the MagPurix® (Zinexts Life Science Corp.) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) and AriaMx Real-time PCR System (Agilent Technologies) | CGT | <i>C. albicans</i> <i>G. vaginalis</i> <i>T. vaginalis</i> |

| | | | | | |
|---|---|--|---|------|---|
| 3 | Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS) (Zaragoza, Spain) | Genital ulcer swabs | StarMag 96x4 Universal Cartridge (Seegene), using the Microlab STAR Let automatic extraction System (Hamilton) + DPrime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) | HHT | HSV-1 HSV-2 <i>T. pallidum</i> |
| 4 | Health Service Laboratories (London, UK) | Urogenital clinical swabs Urine Urogenital clinical ThinPrep specimens | Qiagen Symphony Virus Mini Kit using the automated Qiagen Symphony Sample Preparation module + Rotor-Gene Q (Qiagen) | SPO1 | <i>C. trachomatis</i> <i>N. gonorrhoeae</i> <i>U. urealyticum</i> <i>U. parvum</i> <i>G. vaginalis</i> <i>M. genitalium</i> <i>T. vaginalis</i> HSV-1 HSV-2 |

Table 15. Site, sample type, workflow and target

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV, NPV values for VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following table:

| Site | Comparator assay | Sample type | Target | TP | TN | FP | FN | Sensitivity | Specificity | PPV | NPV |
|----------------|--------------------------------|--------------------------|-----------------------|-----|-----|----|-------------|------------------|---------------|------------------|---------------|
| 1 | Reference method * | All types | <i>C. trachomatis</i> | 43 | 274 | 0 | 0 | 1 (0.91-1) | 1 (0.98-1) | 1 (0.91-1) | 1 (0.98-1) |
| | | Vaginal swabs | | 5 | 80 | 0 | 0 | 1 (0.47-1) | 1 (0.95-1) | 1 (0.47-1) | 1 (0.95-1) |
| | | Urogenital/genital swabs | | 37 | 102 | 0 | 0 | 1 (0.90-1) | 1 (0.96-1) | 1 (0.90-1) | 1 (0.96-1) |
| | | All types | <i>M. genitalium</i> | 3 | 313 | 1 | 0 | 1 (0.29-1) | 0.99 (0.98-1) | 1 (0.29-1) | 0.99 (0.98-1) |
| | | Urogenital/genital swabs | | 3 | 135 | 1 | 0 | 1 (0.29-1) | 0.99 (0.96-1) | 1 (0.29-1) | 0.99 (0.96-1) |
| | | All types | <i>N. gonorrhoeae</i> | 12 | 305 | 0 | 0 | 1 (0.73-1) | 1 (0.98-1) | 1 (0.73-1) | 1 (0.98-1) |
| | | Vaginal swabs | | 1 | 84 | 0 | 0 | 1 (0.02-1) | 1 (0.95-1) | 1 (0.02-1) | 1 (0.95-1) |
| | | Urogenital/genital swabs | | 2 | 137 | 0 | 0 | 1 (0.15-1) | 1 (0.97-1) | 1 (0.15-1) | 1 (0.97-1) |
| | | Rectal /anal swabs | | 1 | 37 | 0 | 0 | 1 (0.02-1) | 1 (0.90-1) | 1 (0.02-1) | 1 (0.90-1) |
| | | Urethral swabs | | 8 | 18 | 0 | 0 | 1 (0.63-1) | 1 (0.81-1) | 1 (0.63-1) | 1 (0.81-1) |
| | | All types | <i>T. vaginalis</i> | 17 | 300 | 0 | 0 | 1 (0.80-1) | 1 (0.98-1) | 1 (0.80-1) | 1 (0.98-1) |
| | | Vaginal swabs | | 15 | 70 | 0 | 0 | 1 (0.78-1) | 1 (0.94-1) | 1 (0.78-1) | 1 (0.94-1) |
| | | Urogenital swabs | | 2 | 137 | 0 | 0 | 1 (0.15-1) | 1 (0.97-1) | 1 (0.15-1) | 1 (0.97-1) |
| | | All types | <i>U. urealyticum</i> | 18 | 297 | 1 | 1 | 0.94 (0.74-0.99) | 0.99 (0.98-1) | 0.94 (0.74-0.99) | 0.99 (0.98-1) |
| | | Vaginal swabs | | 5 | 80 | 0 | 0 | 1 (0.47-1) | 1 (0.95-1) | 1 (0.47-1) | 1 (0.95-1) |
| | | Urogenital swabs | | 10 | 128 | 1 | 0 | 1 (0.69-1) | 0.99 (0.95-1) | 1 (0.69-1) | 0.99 (0.95-1) |
| | | All types | <i>U. parvum</i> | 58 | 258 | 1 | 0 | 1 (0.93-1) | 0.99 (0.97-1) | 1 (0.93-1) | 0.99 (0.97-1) |
| | | Vaginal swabs | | 20 | 65 | 0 | 0 | 1 (0.83-1) | 1 (0.94-1) | 1 (0.83-1) | 1 (0.94-1) |
| | Urogenital swabs | 23 | | 115 | 1 | 0 | 1 (0.85-1) | 0.99 (0.95-1) | 1 (0.85-1) | 0.99 (0.95-1) | |
| | All types | <i>M. hominis</i> | 31 | 286 | 0 | 0 | 1 (0.88-1) | 1 (0.98-1) | 1 (0.88-1) | 1 (0.98-1) | |
| | Vaginal swabs | | 12 | 73 | 0 | 0 | 1 (0.73-1) | 1 (0.95-1) | 1 (0.73-1) | 1 (0.95-1) | |
| | Urogenital swabs | | 17 | 122 | 0 | 0 | 1 (0.80-1) | 1 (0.97-1) | 1 (0.77-1) | 1 (0.97-1) | |
| | Reference molecular methods ** | All types | HSV-1 | 105 | 211 | 0 | 1 | 0.99 (0.94-1) | 1 (0.98-1) | 0.99 (0.94-1) | 1 (0.98-1) |
| | | Anal swabs | | 24 | 14 | 0 | 0 | 1 (0.85-1) | 1 (0.76-1) | 1 (0.85-1) | 1 (0.76-1) |
| Genital swabs | | 46 | | 93 | 0 | 0 | 1 (0.92-1) | 1 (0.96-1) | 1 (0.92-1) | 1 (0.96-1) | |
| Urethral swabs | | 10 | | 16 | 0 | 0 | 1 (0.69-1) | 1 (0.79-1) | 1 (0.69-1) | 1 (0.79-1) | |
| Vaginal swabs | | 25 | | 59 | 0 | 1 | 0.96 (0.80- | 1 (0.93-1) | 0.96 (0.80- | 1 (0.93-1) | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|-----------------------|--|----------------|-----|----|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------|-------|--|--|
| | | | HSV-2 | | | | | | | | 0.99) | | 0.99) | | |
| | | | | All types | 91 | 97 | 0 | 1 | 0.989 (0.94-1) | 1 (0.98-1) | 0.989 (0.94-1) | 1 (0.98-1) | | | |
| | | | | Anal swabs | 15 | 23 | 0 | 0 | 1 (0.78-1) | 1 (0.85-1) | 1 (0.78-1) | 1 (0.85-1) | | | |
| | | | | Genital swabs | 47 | 91 | 0 | 1 | 0.97 (0.88-1) | 1 (0.96-1) | 0.97 (0.88-1) | 1 (0.96-1) | | | |
| | | | | Urethral swabs | 8 | 18 | 0 | 0 | 1 (0.63-1) | 1 (0.81-1) | 1 (0.63-1) | 1 (0.81-1) | | | |
| | | | | Vaginal swabs | 21 | 64 | 0 | 0 | 1 (0.83-1) | 1 (0.94-1) | 1 (0.83-1) | 1 (0.94-1) | | | |
| 2 | Microscopy + Broth culture | Genital tract samples | <i>C. albicans</i> <i>G. vaginalis</i> <i>T. vaginalis</i> | 179 | 48 | 3 | 2 | 0.98 (0.95-0.99) | 0.94 (0.82-0.98) | 0.98 (0.94-0.99) | 0.96 (0.85-0.99) | | | | |
| | Culture in Diamond's TYI medium + FTD STD9 (Fast Track Diagnostics) | | <i>T. vaginalis</i> | 54 | 177 | 1 | 0 | 1 (0.91-1) | 0.99 (0.96-0.99) | 0.98 (0.89-0.99) | 1 (0.97-1) | | | | |
| | Culture in Sabouraud dextrose agar with cloramfenicol + microscopy | | <i>C. albicans</i> | 88 | 142 | 0 | 2 | 0.97 (0.91-0.99) | 1 (0.96-1) | 1 (0.94-1) | 0.98 (0.94-0.99) | | | | |
| | Gram-stain smears | | <i>G. vaginalis</i> | 152 | 78 | 2 | 0 | 1 (0.96-1) | 0.97 (0.9-0.99) | 0.98 (0.94-0.99) | 1 (0.94-1) | | | | |
| 3 | Allplex™ Genital Ulcer Assay (Seegene) | Genital ulcer swabs | HSV-1 | 52 | 208 | 0 | 1 | 0.98 (0.89-1) | 1 (0.98-1) | 1 (0.91-1) | 0.99 (0.96-0.99) | | | | |
| | | | HSV-2 | 54 | 206 | 1 | 0 | 1 (0.93-1) | 0.99 (0.97-1) | 0.98 (0.89-0.99) | 1 (0.97-1) | | | | |
| | | | <i>T. pallidum</i> | 31 | 230 | 0 | 0 | 1 (0.88-1) | 1 (0.98-1) | 1 (0.85-1) | 1 (0.97-1) | | | | |

Table 16. True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV, NPV values for VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit

* Reference method: A combination of different conventional techniques (culture methods, direct visualization by microscopy) and molecular methods: Allplex™ STI Essential Assay™ (Seegene); Chlamydia trachomatis PCR Kit (GeneProof®); the LightCycler® HSV 1/2 Qual Kit (Roche Diagnostics); the HSV1, HSV2, VZV R-gene® (bioMérieux); Abbott RealTime CT/NG assay (Abbott)).

** Reference molecular methods: LightCycler-HSV 1/2 Qual Kit molecular assay (Roche Diagnosis); and HSV-1, HSV-2, VZV R-gene® (bioMérieux).

Results of sensitivity and specificity obtained during the comparative-retrospective observational study performed at the Health Service Laboratories (London, UK), compared to the routine method (FTD STD9 (Fast Track Diagnostics)), were as follows:

| Specificity (VIASURE vs. FTD STD9) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|----------------------|--------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|---------|--------|---------|--------|--------------|
| Sample Type | Chlamydia trachomatis | | Neisseria gonorrhoeae | | Ureaplasma (UU & UP) | | Gardnerella vaginalis | | Mycoplasma genitalium | | Trichomonas vaginalis | | HSV I | | HSV II | | Total SP (%) |
| | n Tests | SP (%) | n Tests | SP (%) | n Tests | SP (%) | n Tests | SP (%) | n Tests | SP (%) | n Tests | SP (%) | n Tests | SP (%) | n Tests | SP (%) | |
| Urine | 48 | 100 | 55 | 100 | 39 | 97.5 | 40 | 87 | 50 | 100 | 56 | 100 | 60 | 100 | 55 | 100 | 98.3 |
| Swab | 57 | 100 | 58 | 100 | 40 | 97.6 | 37 | 64.9 | 56 | 100 | 64 | 100 | 62 | 100 | 57 | 100 | 95.4 |
| ThinPrep | 29 | 100 | 33 | 100 | 13 | 100 | 15 | 83 | 26 | 100 | 32 | 100 | 30 | 100 | 26 | 100 | 98.6 |

Table 17. Specificity for VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit obtained at the Health Service Laboratories comparative-retrospective observational study. SP = Specificity; n = number

| Sensitivity (VIASURE vs. FTD STD9) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|----------------------|--------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|----------|--------|----------|--------|--------------|
| Sample Type | Chlamydia trachomatis | | Neisseria gonorrhoeae | | Ureaplasma (UU & UP) | | Gardnerella vaginalis | | Mycoplasma genitalium | | Trichomonas vaginalis | | HSV I | | HSV II | | Total SE (%) |
| | n sample | SE (%) | n sample | SE (%) | n sample | SE (%) | n sample | SE (%) | n sample | SE (%) | n sample | SE (%) | n sample | SE (%) | n sample | SE (%) | |
| Urine | 16 | 93.8 | 8 | 87.5 | 23 | 100 | 21 | 95.2 | 12 | 75 | 5 | 100 | 2 | 100 | 7 | 85.7 | 93.3 |
| Swab | 10 | 100 | 10 | 100 | 27 | 100 | 30 | 100 | 11 | 90.9 | 3 | 100 | 5 | 100 | 10 | 100 | 99.1 |
| ThinPrep | 3 | 100 | 0 | n.a. | 19 | 100 | 18 | 88.9 | 12 | 100 | 1 | 100 | 3 | 100 | 6 | 83.3 | 95.2 |

Table 18. Sensitivity for VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit obtained at the Health Service Laboratories comparative-retrospective observational study. SE = Sensitivity; n = number.

Results show high agreement to detect *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis*, HSV-1, HSV-2, *T. pallidum*, *C. albicans*, and/or *G. vaginalis*, using VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit.

ANNEX 1

OPEN FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

| PRODUCT | REFERENCE |
|--|------------|
| VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile | VS-SP0112L |
| VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile | VS-SP0112H |
| VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile | VS-SP0113L |
| VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile | VS-SP0113H |

Table A1 1. References

A1.1 Principle of the procedure

VIASURE Sexual Health Panel I 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.

The reaction mixes places in each well of **Sexual Health Panel I** 8-well strip (SP01) allow the detection of the specific target pathogens through specific genes in the following channels (Table A1.2):

| | Code | Target | Channel | Gene | |
|--|------|--------|-------------------------------|------|---|
| | 1 | NMT | <i>Chlamydia trachomatis</i> | FAM | ORF2 of chlamydial plasmid |
| | | | <i>Mycoplasma genitalium</i> | HEX* | <i>mgPa</i> |
| | | | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | ROX | <i>porA</i> and <i>opA</i> |
| | | | Internal Control (IC) | Cy5 | - |
| | 2 | URE | <i>Trichomonas vaginalis</i> | FAM | <i>T. vaginalis</i> -2-kb repeated sequence |
| | | | <i>Ureaplasma urealyticum</i> | HEX* | <i>ure</i> |
| | | | <i>Ureaplasma parvum</i> | ROX | <i>ure</i> |
| | | | <i>Mycoplasma hominis</i> | Cy5 | <i>gidC</i> |
| | 3 | HHT | HSV-1 | FAM | <i>US4</i> |
| | | | Internal control (IC) | HEX* | - |
| | | | HSV-2 | ROX | <i>US6</i> |
| | | | <i>Treponema pallidum</i> | Cy5 | <i>16S rRNA</i> |
| | 4 | CGT | <i>Trichomonas vaginalis</i> | FAM | <i>T. vaginalis</i> -2-kb repeated sequence |
| | | | Internal control (IC) | HEX* | - |
| | | | <i>Candida albicans</i> | ROX | <i>5,8S rRNA</i> |
| | | | <i>Gardnerella vaginalis</i> | Cy5 | <i>16S rRNA</i> |

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. Note that the first well is marked with a hole on the top right corner.

A1.2 Reagents provided

VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables A1.3 and A1.4. 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. (Consult the thermocycler compatibility on CerTest's website www.cerTEST.es).

| Reagent/Material | Description | Concentration Range | Colour | Amount |
|--|---|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| <i>Sexual Health Panel I</i> 8-well strips | Lyoprotectors and Stabilizers | ±6 g/100 mL* | White (Opaque) | 12 x 8-well strip |
| | Nucleotide triphosphate (dNTPs) | ±1 mM* | | |
| | Primers and Probes | 0.2-1 nMol/μL* | | |
| | Enzymes | 10-100 U/rxn* | | |
| Rehydration Buffer | Saline Solution Mixture | ±13 mM | Blue | 1 vial x 1.8 mL |
| | Buffer (TRIS, pH) | ±67 mM | | |
| <i>Sexual Health Panel I</i> Positive Control | Non-infectious synthetic lyophilized DNA | 1.9x10 ⁴ copies/μL* | Red | 1 vial |
| Negative control | RNase/DNase free water | 1 g/mL | Violet | 1 vial x 1 mL |
| Water RNase/DNase free | RNase/DNase free water | 1 g/mL | White | 1 vial x 1 mL |
| Tear-off 8-cap strips | Optical caps for sealing wells during thermal cycling | - | Transparent | 12 x 8-cap strip |

Table A1 3. Reagents and materials provided in VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-SP0112L and VS-SP0112H.

* For component in stabilized format, the concentration range means after rehydration.

| Reagent/Material | Description | Concentration Range | Colour | Amount |
|--|---|--------------------------------|-------------------|------------------|
| <i>Sexual Health Panel I</i> 96-well plate | Lyoprotectors and Stabilizers | ±6 g/100 mL* | White (Opaque) | 1 plate |
| | Nucleotide triphosphate (dNTPs) | ±1 mM* | | |
| | Primers and Probes | 0.2-1 nMol/μL* | | |
| | Enzymes | 10-100 U/rxn* | | |
| Rehydration Buffer | Saline Solution Mixture | ±13 mM | Blue | 1 vial x 1.8 mL |
| | Buffer (TRIS, pH) | ±67 mM | | |
| <i>Sexual Health Panel I</i> Positive Control | Non-infectious synthetic lyophilized DNA | 1.9x10 ⁴ copies/μL* | Red | 1 vial |
| Negative control | RNase/DNase free water | 1 g/mL | Violet | 1 vial x 1 mL |
| Water RNase/DNase free | RNase/DNase free water | 1 g/mL | White | 1 vial x 1 mL |
| Tear-off 8-cap strips | Optical caps for sealing wells during thermal cycling | - | Transparent | 12 x 8-cap strip |

Table A1 4. Reagents and materials provided in VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-SP0113L and VS-SP0113H.

* For component in stabilized format, the concentration range means after rehydration.

A1.3 Test procedure

A1.3.1 Lyophilized positive control

Sexual Health Panel I 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 *Sexual Health Panel I* Positive Control (red vial) by adding 400 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.

Please note: In case the number of reactions required/needed is less than supplied on one strip or plate, before removing the protective seal, carefully cut out the required wells and store the rest inside the bag with the desiccant. Peel off protective aluminium seal from the plate or strips you need for the assay. **Make sure to put the strip in the correct direction (Table A1 2). The first well is marked with a hole on the top right corner.**

- 1) Reconstitute the number of strips 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 *Sexual Health Panel I* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) into the different wells and close them with the provided caps. It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 1) 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 | Initial denaturation | 2 min | 95°C |
| 45 | Denaturation | 10 sec | 95°C |
| | Annealing/Extension (Data collection*) | 50 sec | 60°C |

Table A1 5. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM, ROX, Cy5 and/or HEX channels as indicated in Table A1.2. Depending on the equipment used, select in the thermocycler only the proper channels where targets are detected (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ANNEX 2

OPEN FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL

Annex for the following references:

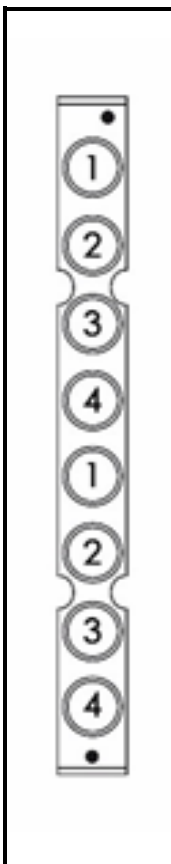
| PRODUCT | REFERENCE |
|--|-------------|
| VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile | VS-SP0112LE |
| VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile | VS-SP0112HE |
| VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile | VS-SP0113LE |
| VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile | VS-SP0113HE |

Table A2. 1. References.

A2.1 Principle of the procedure

VIASURE Sexual Health Panel I 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.

The reaction mixes places in each well of **Sexual Health Panel I** 8-well strip (SP01) allow the detection of the specific target pathogens through specific genes in the following channels (Table A2.2):



| Code | Target | Channel | Gene |
|------|-------------------------------|---------|---|
| 1NMT | <i>Chlamydia trachomatis</i> | FAM | ORF2 of chlamydial plasmid |
| | <i>Mycoplasma genitalium</i> | HEX* | <i>mgPa</i> |
| | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | ROX | <i>porA</i> and <i>opA</i> |
| | Extraction Control (EC) | Cy5 | - |
| URE | <i>Trichomonas vaginalis</i> | FAM | <i>T. vaginalis</i> -2-kb repeated sequence |
| | <i>Ureaplasma urealyticum</i> | HEX* | <i>ure</i> |
| | <i>Ureaplasma parvum</i> | ROX | <i>ure</i> |
| | <i>Mycoplasma hominis</i> | Cy5 | <i>yidC</i> |
| HHT | HSV-1 | FAM | <i>US4</i> |
| | Internal control (IC) | HEX * | - |
| | HSV-2 | ROX | <i>US6</i> |
| | <i>Treponema pallidum</i> | Cy5 | <i>16S rRNA</i> |
| CGT | <i>Trichomonas vaginalis</i> | FAM | <i>T. vaginalis</i> -2-kb repeated sequence |
| | Internal control (IC) | HEX * | - |
| | <i>Candida albicans</i> | ROX | <i>5,8S rRNA</i> |
| | <i>Gardnerella vaginalis</i> | Cy5 | <i>16S rRNA</i> |

Table A2. 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.cerfest.es. Note that the fist well is marked with a hole on the top right corner.

A2.2 Reagents provided

VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables A2.3 and A2.4. 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 A2.3 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices. Table A2.4 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible devices. (Consult the thermocycler compatibility on CerTest's website www.cerTEST.es).

| Reagent/Material | Description | Concentration Range | Colour | Amount |
|--|---|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| <i>Sexual Health Panel I</i> 8-well strips § | Lyoprotectors and Stabilizers | ±6 g/100 mL* | White (Opaque) | 12 x 8-well strip |
| | Nucleotide triphosphate (dNTPs) | ±1 mM* | | |
| | Primers and Probes | 0.2-1 nMol/μL* | | |
| | Enzymes | 10-100 U/rxn* | | |
| Rehydration Buffer | Saline Solution Mixture | ±13 mM | Blue | 1 vial x 1.8 mL |
| | Buffer (TRIS, pH) | ±67 mM | | |
| <i>Sexual Health Panel I</i> Positive Control | Non-infectious synthetic lyophilized DNA | 1.9x10 ⁴ copies/μL* | Red | 1 vial |
| Extraction Control | Non-infectious nucleic acid lyophilized | 2x10 ⁴ copies/μL* | Green | 1 vial |
| Negative control | RNase/DNase free water | 1 g/mL | Violet | 1 vial x 1 mL |
| Water RNase/DNase free | RNase/DNase free water | 1 g/mL | White | 1 vial x 1 mL |
| Tear-off 8-cap strips | Optical caps for sealing wells during thermal cycling | - | Transparent | 12 x 8-cap strip |

Table A2. 3. Reagents and materials provided in VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-SP0112LE and VS-SP0112HE.

* For component in stabilized format, the concentration range means after rehydration.

§ All reaction mixes of VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit (Ref: VS-SP0112LE and VS-SP0112HE) contain IC, except for NMT reaction mix.

| Reagent/Material | Description | Concentration Range | Colour | Amount |
|--|---|--------------------------------|-------------------|------------------|
| <i>Sexual Health Panel I</i> 96-well plate § | Lyoprotectors and Stabilizers | ±6 g/100 mL* | White (Opaque) | 1 plate |
| | Nucleotide triphosphate (dNTPs) | ±1 mM* | | |
| | Primers and Probes | 0.2-1 nMol/μL* | | |
| | Enzymes | 10-100 U/rxn* | | |
| Rehydration Buffer | Saline Solution Mixture | ±13 mM | Blue | 1 vial x 1.8 mL |
| | Buffer (TRIS, pH) | ±67 mM | | |
| <i>Sexual Health Panel I</i> Positive Control | Non-infectious synthetic lyophilized DNA | 1.9x10 ⁴ copies/μL* | Red | 1 vial |
| Extraction Control | Non-infectious nucleic acid lyophilized | 2x10 ⁴ copies/μL* | Green | 1 vial |
| Negative control | RNase/DNase free water | 1 g/mL | Violet | 1 vial x 1 mL |
| Water RNase/DNase free | RNase/DNase free water | 1 g/mL | White | 1 vial x 1 mL |
| Tear-off 8-cap strips | Optical caps for sealing wells during thermal cycling | - | Transparent | 12 x 8-cap strip |

Table A2. 4 Reagents and materials provided in VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-SP0113LE and VS-SP0113HE.

* For component in stabilized format, the concentration range means after rehydration.

§ All reaction mixes of VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit (Ref: VS-SP0113LE and VS-SP0113HE) contain IC, except for NMT reaction mix.

A2.3 Test procedure

A2.3.1 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 for reconstituting the lyophilized *Sexual Health Panel I* Positive Control in an area away from the other components.

A2.3.2 Lyophilized positive control

Sexual Health Panel I 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 *Sexual Health Panel I* Positive Control (red vial) by adding 400 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.

A2.3.3 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.

Please note: In case the number of reactions required/needed is less than supplied on one strip or plate, before removing the protective seal, carefully cut out the required wells and store the rest inside the bag with the desiccant. Peel off protective aluminium seal from the plates or strips you need for the assay. **Make sure to put the strip in the correct direction (Table A2 2). The first well is marked with a hole on the top right corner.**

- 1) Reconstitute the number of strips 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 corresponding wells of the strip for negative control.

Add 5 µL of DNA sample in different wells.

Add 5 µL of reconstituted *Sexual Health Panel I* Positive Control (red vial) in the reserved wells for positive control.

Add 1 µL of Extraction Control (EC, green vial) into the Positive Control and Negative Control wells of NMT reaction mix (1NMT).

If the EC is only used as PCR inhibition control, add 1 μ L of the EC (green vial) to each sample well of NMT reaction mix (1NMT).

Close the wells with the caps provided. It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate.

Load the plate or the strips 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 | Initial denaturation | 2 min | 95°C |
| 45 | Denaturation | 10 sec | 95°C |
| | Annealing/Extension (Data collection*) | 50 sec | 60°C |

Table A2. 5 PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM, ROX, Cy5 and/or HEX channels as indicated in Table A2.2. Depending on the equipment used, select in the thermocycler only the proper channels where targets are detected (to check most common detection channels consult website www.certest.es).

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de DNA de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y/o *Mycoplasma hominis*; Herpes virus 1, Herpes virus 2 y/o *Treponema pallidum*; *Candida albicans* y/o *Gardnerella vaginalis* en muestras del tracto genital y muestras de orina procedentes de pacientes con signos y síntomas de enfermedad de transmisión sexual. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de las enfermedades de transmisión sexual en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de muestras clínicas, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (quencher) para detectar *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum* y *M. hominis*; HSV-1, HSV-2 y *T. pallidum*; *C. albicans* y *G. vaginalis*.

2. Introducción y explicación

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) representan un grupo de enfermedades que afectan la salud sexual y reproductiva de millones de personas, siendo un problema de interés público (Rodríguez-Granger et al., 2020). Los agentes etiológicos responsables de las ITS incluyen hongos, bacterias, parásitos y virus (Sharifi-Rad et al., 2021). Algunos de estos microorganismos son eliminados al cabo de un período de tiempo, mientras que otros son recurrentes y se mantienen en el organismo de forma asintomática, permitiendo el progreso de la enfermedad y generando consecuencias como inflamaciones del tracto genito-urinario, infertilidad e incluso el desarrollo de cáncer (Sharifi-Rad et al., 2021; World Health Organization, 2022).

N. gonorrhoeae es una bacteria (gonococo) conocida principalmente en todo el mundo como el agente etiológico de la gonorrea (Kirkcaldy et al., 2019; Młynarczyk-Bonikowska et al., 2020; Unemo et al., 2019). *N. gonorrhoeae* generalmente causa infecciones de mucosas del tracto urogenital (Kirkcaldy et al., 2019; Unemo et al., 2019), infectando predominantemente epitelios columnares y de transición, aunque también puede adherirse al epitelio escamoso estratificado del ectocérvix (Unemo et al., 2019). Estas infecciones por *N. gonorrhoeae* suelen provocar cervicitis en las mujeres y uretritis en ambos sexos (Springer & Salen, 2023; Unemo et al., 2019). La mayoría de los varones con uretritis gonocócica son sintomáticos, sin embargo, un número sustancialmente menor de mujeres con gonorrea urogenital son sintomáticas y, cuando se presentan, los síntomas son inespecíficos (Unemo et al., 2019). Si las infecciones no se detectan y/o no se tratan adecuadamente, las infecciones ascendentes, como la epididimitis y la salpingitis, pueden dar lugar a diversas complicaciones y secuelas graves, sobre todo en las mujeres, que soportan la mayor carga de la enfermedad; estas complicaciones y secuelas incluyen la enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), el dolor pélvico crónico, el embarazo ectópico y la infertilidad (CDC, 2021^a; Kirkcaldy et al., 2019; Springer & Salen, 2023; Unemo et al., 2019).

C. trachomatis es una bacteria gram-negativa, perteneciente al género *chlamydophila*, responsable de la enfermedad infecciosa de transmisión sexual (ETS) denominada Chlamydia (Mohseni M et al., 2023). En EE.UU., es la infección bacteriana más notificada y, a nivel mundial, es la ITS prevalente más común (Huai et al., 2020; Mohseni M et al., 2023). Los tres biovarios de *C. trachomatis*, cada uno de los cuales consta de varios serovares o

genotipos, causan infecciones genitales, linfogranuloma venéreo (LGV: enfermedad ulcerosa genital que afecta al tejido linfoide) y una infección ocular denominada "tracoma" (Mohseni M et al., 2023), que es la principal causa de ceguera por infección en todo el mundo (Mohseni M et al., 2023; World Health Organization, 2016). En las mujeres, la infección puede manifestarse como cervicitis, uretritis, enfermedad inflamatoria pélvica, perihepatitis o proctitis, mientras que, en los hombres, la infección puede provocar uretritis, epididimitis, prostatitis, proctitis o artritis reactiva (Mohseni M et al., 2023; World Health Organization, 2016).

La infección por *Trichomonas vaginalis* es una de las enfermedades de transmisión sexual (ETS) no víricas más comunes en el mundo (Korich et al., 2020; Muzny et al., 2020; Van Gerwen & Muzny, 2019). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó 156 millones de casos de infección por *T. vaginalis* en todo el mundo en 2016, lo que representa casi la mitad de la incidencia mundial de ITS ese año (Muzny et al., 2020; Van Gerwen & Muzny, 2019). La infección por *T. vaginalis* se ha asociado con vaginitis, cervicitis y uretritis, rotura prematura de membranas y parto prematuro en mujeres embarazadas (Muzny et al., 2020), sin embargo, el 75-80% de los casos son asintomáticos, con infecciones que duran de meses a años (Korich et al., 2020). A nivel mundial, la prevalencia estimada de *T. vaginalis* en mujeres de 15 a 49 años es del 5,3% (superior a las estimaciones de clamidia, gonorrea y sífilis) y del 0,6% en hombres (superior a las estimaciones de sífilis) (Muzny et al., 2020). La infección por *T. vaginalis* también se ha asociado con un mayor riesgo de adquisición y transmisión del VIH en las mujeres (Muzny et al., 2019).

Mycoplasma hominis coloniza el tracto urogenital inferior y se asocia a infecciones urogenitales, en particular vaginosis bacteriana y uretritis no gonocócica, pero también está implicado en infecciones extra genitales, como fiebre posparto o post-aborto, en infecciones de heridas post-cesárea o tras una histerectomía (Posse et al., 2018; Rufo et al., 2021; Rummyantseva et al., 2019). En neonatos puede causar meningitis, abscesos cerebrales e infecciones oculares, y en adultos se han descrito bacteriemias, artritis séptica, osteítis, endocarditis, mediastinitis, abscesos cerebrales e infecciones respiratorias (Posse et al., 2018).

M. genitalium es uno de los procariontes más pequeños conocidos por autorreplicarse, que ha surgido en las últimas décadas como patógeno de transmisión sexual (Gnanadurai & Fifer, 2020). Cuando *M. genitalium* infecta al huésped, causa inflamación en el tracto urogenital, lo que provoca flujo vaginal, disuria o el posible desarrollo de enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), cervicitis, parto prematuro, aborto espontáneo y posible infertilidad en las mujeres (CDC, 2021b; Jensen et al., 2022; Molenaar et al., 2018; Yu et al., 2023), así como uretritis no gonocócica (UNG) sintomática y asintomática, uretritis no gonocócica no clamidial (UNNGC), disuria y secreción en hombres (CDC, 2021b; Jensen et al., 2022).

U. urealyticum y *U. parvum* son bacterias oportunistas que se encuentran en el tracto urogenital humano, tanto en individuos sanos como en pacientes sintomáticos (Horner et al., 2018; Rummyantseva et al., 2019). Mientras que *U. parvum* está más comúnmente implicada en la enfermedad clínica, *U. urealyticum* se encuentra más frecuentemente en la infección urogenital (Sprong et al., 2020). Estas bacterias causan inflamación y provocan vaginosis bacteriana, corioamnionitis o infertilidad, entre otras (Rufo et al., 2021).

Candida forma parte de la flora normal de muchas mujeres, y normalmente es asintomática, pero en determinadas situaciones puede volverse patogénica ((Dadar et al., 2018; Jeanmonod & Jeanmonod, 2021; Willems et al., 2020). La candidiasis vulvo-vaginal (CVV) es la infección humana por *Candida* más prevalente, de la que se estima que afecta aproximadamente al 70-75% de las mujeres en algún momento de sus vidas, y a nivel global, alrededor del 8% de ellas sufren CVV recurrente (si se producen más de tres episodios por año)

(Denning et al., 2018; Jeanmonod & Jeanmonod, 2021; Willems et al., 2020). *C. albicans* es la responsable de alrededor del 90% de los casos de dicho síndrome, siendo las especies de *Candida* "no *albicans*", y en particular *C. glabrata*, la responsable de la mayoría del resto de casos (Jeanmonod & Jeanmonod, 2021; Willems et al., 2020). Sin embargo, es importante destacar que para este proceso patológico no se dispone de datos epidemiológicos detallados, debido al autotratamiento (sin diagnóstico), imprecisión en el autodiagnóstico, y a una sobreestimación de casos debido a los informes epidemiológicos basados únicamente en cultivo (ya que el 10% de las mujeres son asintomáticas con cultivos positivos a *Candida*) (Jeanmonod & Jeanmonod, 2021; Willems et al., 2020).

Gardnerella vaginalis es una bacteria anaerobia facultativa gram-variable perteneciente a la familia *Bifidobacteriaceae*, presente en el 95-100% de los casos de Vaginosis Bacteriana (VB), por lo que en origen se pensó que era el patógeno primario en la VB (Margolis & Fredricks, 2014; Muzny et al., 2019). Sin embargo, se ha encontrado *G. vaginalis* en mujeres con microbiota vaginal normal (con una prevalencia tan alta como del 70-85% en mujeres VB negativas), lo que sugiere que este microorganismo puede ser parte de la flora vaginal normal (Margolis & Fredricks, 2014; Muzny et al., 2019). La VB es altamente prevalente en mujeres en edad reproductiva, afectando al 8-23% de ellas, tanto de forma sintomática como asintomática (Margolis & Fredricks, 2014).

Los Herpes Simplex Virus Humanos (HSV) tipos 1 y 2 son dos de los virus humanos más prevalentes en el mundo, asociados comúnmente con enfermedades como el herpes labial, herpes genital, queratinitis estromal herpética, meningitis y encefalitis (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). El HSV afecta principalmente a la piel y membranas de las mucosas, causando infecciones persistentes que consisten en periodos de quiescencia (latencia) y de enfermedad recurrente (reactivación) (Cole, 2020; Minaya et al., 2017). La transmisión tanto de HSV-1 como HSV-2 se produce a través del contacto oral, mientras que las infecciones por HSV-2 se producen más tarde, normalmente a través de transmisión sexual, y las manifestaciones clínicas de estos virus son muy variables: asintomáticas, leves o potencialmente mortales (Cole, 2020; WHO, 2023; Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). En la mayoría de individuos inmunocompetentes, el HSV causa enfermedad leve que se resuelve sola (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). Sin embargo, la infección por HSV se asocia también con una alta morbilidad y mortalidad en ciertos individuos, como pacientes inmunocomprometidos que padecen de infecciones por HSV recurrentes (Cole, 2020; Zhu & Viejo-Borbolla, 2021).

La espiroqueta *Treponema pallidum* y otros treponemas patogénicos causan sífilis venérea, pián, sífilis endémica y pinta, todas ellas infecciones multifásicas que, a pesar de sus similitudes, pueden diferenciarse mediante criterios clínicos, epidemiológicos y geográficos (Radolf et al., 2016; Tudor et al., 2022). Sin embargo, *T. pallidum* subsp. *pallidum* es la única subespecie treponema asociada a enfermedad venérea (Tudor et al., 2022). Los treponemas patogénicos son microorganismos no cultivables y de crecimiento lento con idénticas morfologías de onda plana, que apenas toleran la disecación, la temperatura elevada y la tensión de oxígeno ambiental; rasgos que explican por qué una transmisión eficiente requiere de un estrecho contacto personal (Radolf et al., 2016).

Los procedimientos de diagnóstico convencional requieren del aislamiento y cultivo del agente infeccioso a partir de muestras clínicas, lo que consume mucho tiempo. Los tests de amplificación de ácidos nucleicos, como la PCR en tiempo real, permite solventar algunas de estas limitaciones.

3. Procedimiento

VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección cualitativa simultánea de DNA de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*; Herpes virus 1, Herpes virus 2, *Treponema pallidum*; *Candida albicans* y/o *Gardnerella vaginalis* en muestras del tracto genital y muestras de orina. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de estos microorganismos se lleva a cabo mediante la amplificación de una región diana conservada de genes específicos, utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente (Vea las Tablas A1 2. y A2 2. en los Anexos 1 y 2, respectivamente).

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

VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit incluye en cada pocillo todos los componentes necesarios para el ensayo de PCR en tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón y polimerasa) en un formato estabilizado, así como un **control interno o de extracción** con el que verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación.

El control interno (CI) verifica si la reacción de amplificación funciona correctamente. Si la reacción PCR se inhibe por la presencia de un artefacto/inhibidor o porque el pocillo está incorrectamente rehidratado, este control puede resultar negativo.

El control de extracción (CE) controla la eficiencia del método de extracción y verifica la reacción PCR. Se suministra en un vial adicional y debe añadirse a las muestras antes del proceso de extracción.

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en el Anexo 1 para "open format" con productos con control interno y el anexo 2 para "open format" con productos con control de extracción.

5. Reactivos y equipos a suministrar por el usuario

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de DNA.
- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio: - 30°C a - 10°C y / o ≤ -70°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.
- Blanco de muestra (Ver sección 8.2 Extracción DNA).

VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit fue testado en los siguientes equipos: 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies), Cobas z480 Analyzer (Roche Molecular Diagnostics), Rotor-Gene® Q (Qiagen), DTprime real-time PCR instrument (DNA-Technology) and DTlite real-time PCR instrument (DNA-Technology).

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 PCR instrument (DNA-Technology): canal FAM -500*, canal HEX – 1000, canal ROX – 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTlite real-time PCR instrument (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 del kit.
- Evitar vibraciones durante el transporte para evitar la fuga de líquidos.
- 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.
- Para kits de formato abierto (tiras y placas): Para un uso adecuado del kit, se recomienda no rehidratar pocillos adicionales que no necesiten ser utilizados. Si no se utilizan todos los pocillos provistos en una tira o placa de 96 pocillos, la cantidad requerida de pocillos de reacción se puede cortar fácilmente de las tiras de 8 pocillos o placas de 96 pocillos. Si no se utilizan todos los pocillos, se recomienda que los pocillos no utilizados se almacenen en las bolsas de aluminio proporcionadas con el gel de sílice dentro para evitar el contacto con la luz hasta su uso. La bolsa abierta con pocillos no rehidratados a 2-40°C es estable hasta por 12 meses.
- Proteger los componentes de la luz.
- Una vez que los pocillos a emplear se hayan rehidratado, tanto la adición del ácido nucleico como la realización de la qPCR deben realizarse inmediatamente.

La siguiente tabla resume las condiciones de transporte, almacenamiento y uso tanto para el kit completo como para cada componente:

| Componente | Condiciones de transporte | Condiciones de almacenamiento | Condiciones "en-uso" |
|--|--|--|--|
| Kit completo VIASURE <i>Sexual Health Panel I</i> Real Time PCR Detection Kit. | 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. | Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. | * Ver condiciones "en uso" de cada componente. |
| <i>Sexual Health Panel I</i> well-strip o well plate (Ver anexo 1 y 2). | | Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Pocillos no rehidratados en un sobre abierto con el gel de sílice: 2-40°C durante 12 meses. | Temperatura ambiente. |
| Vial <i>Sexual Health Panel I</i> Positive Control | | Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Control Rehidratado: -20°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. | Uso inmediato a temperatura ambiente. |
| Rehydration Buffer | | Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. | Temperatura ambiente. |
| Vial Negative Control | | Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. | Temperatura ambiente. |
| Vial Water RNase/DNase free | | Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. | Temperatura ambiente. |
| Extraction Control | | Antes del uso: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez abierto: 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. | Uso inmediato a temperatura ambiente. |

Tabla 1. Resumen de las condiciones de transporte, almacenamiento y uso para el producto VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit y cada uno de sus componentes.

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*.
- Las instrucciones de uso se deben leer cuidadosamente antes de utilizar VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit. No llevar a cabo el ensayo PCR hasta haber entendido la información sobre procedimientos, precauciones de seguridad y limitaciones descritas en las instrucciones de uso.
- 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 referencias: VS-SP0113LE y VS-SP0113HE). 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.
- Una vez retirado el aluminio protector de las placas o tiras, el usuario final deberá utilizar las placas o las tiras en el menor tiempo posible para proteger la mezcla de reacción de la luz solar.
- A tener en cuenta: en caso de que el número de reacciones requeridas/necesarias sea inferior a la suministrada en una tira o placa, antes de retirar el sello protector, corte con cuidado los pocillos necesarios y guarde el resto dentro de la bolsa con el desecante.
- **Asegurarse de colocar la tira en la dirección correcta. El primer pocillo está marcado con un agujero en la esquina superior derecha. Tener cuidado de no invertir la tira durante el proceso de PCR.**
- 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.
- Una vez abierto el sobre del Control Positivo o del Control de Extracción, rehidratar los viales inmediatamente, utilizarlos en la reacción de PCR o conservarlos correctamente. No se recomienda dejar el vial abierto sin resuspender, ya que esto puede ocasionar el deterioro del reactivo.
- Una vez retirado el sello protector de aluminio de la placa o las tiras, utilícelas inmediatamente para el ensayo qPCR (rehidrate los pocillos, agregue las muestras y coloque las tiras/placa en el termociclador). No se recomienda dejar las tiras o la placa abiertas sin resuspender. Asimismo, una vez rehidratados los pocillos requeridos, se debe añadir el ácido nucleico en cada pocillo y llevarse a cabo el ensayo qPCR inmediatamente.
- 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 de dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE *Sexual Health Panel I* 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 peligroso 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. La hoja de datos de seguridad no se incluye con este producto, sin embargo, puede ser consultada bajo petición a Certest Biotec.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.
- Asegúrese de que la configuración y las condiciones de los ajustes en el termociclador se realizan siguiendo las instrucciones de la sección "Protocolo PCR" de los Anexos 1 y 2 (protocolo DNA/RNA, número de ciclos, temperaturas, etc.).
- El certificado de análisis no se incluye con este producto, sin embargo, se puede solicitar a Certest Biotec en caso de necesidad.

8. Procedimiento del test

Consulte el Anexo 1 para "open format" con productos con control interno y el Anexo 2 para "open format" con productos con control de extracción.

8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection kit fue testado en muestras de orina y en muestras de hisopos del tracto genital recogidos en tampón de lisis o medio de transporte PreservCyt™ (PreservCyt™ Solution, HOLOGIC®). Otros tipos de muestras deben ser validados por el usuario.

La recogida, el almacenamiento y el transporte de las muestras deben mantenerse según las condiciones validadas por el usuario. En general, todos los especímenes deben recogerse y etiquetarse adecuadamente en recipientes limpios con o sin medio de transporte (dependiendo del tipo de muestra), y ser procesados a la mayor brevedad para garantizar la calidad de la prueba. Las muestras clínicas deben transportarse a 2°C-8°C durante un máximo de 24 horas, siguiendo la normativa local y nacional para el transporte de material patógeno. Para el transporte a largo plazo (más de 24 horas), se recomienda el envío a -20°C o menos¹. Se recomienda utilizar muestras frescas para la prueba. Las muestras pueden almacenarse a 2°C-8°C durante un máximo de 24 horas, o congelarse a -20°C o idealmente a -80°C para su conservación. Sin embargo, si las muestras se recogen en PreservCyt™ Solution, deben conservarse a 15°C-30°C durante un máximo de 6 semanas². Deben evitarse los ciclos repetidos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y de los ácidos nucleicos.

¹García-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)*.

² https://www.hologic.com/sites/default/files/2022-05/AW-22719-002_001_02.pdf.

Las muestras clínicas deben ser recogidas, transportadas y almacenadas de acuerdo con las directrices apropiadas del laboratorio y/o los manuales de políticas del laboratorio de microbiología. Como ejemplo, consulte a 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)*.

Nota: Las condiciones de recogida, transporte y almacenamiento de muestras indicadas anteriormente se sugieren en base a las recomendaciones para muestras del tracto genital y muestras de orina destinadas a la detección de ácidos nucleicos, tal y como aparecen en el informe referenciado de recomendaciones de la SEIMC para procedimientos generales de recogida y transporte en microbiología clínica, y en las instrucciones de uso de ThinPrep™. No obstante, recomendamos seguir las directrices del laboratorio y/o los manuales de política del laboratorio de microbiología para el transporte y la conservación adecuados de las muestras.

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 *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit también está disponible con control de extracción (las referencias se incluyen en el Anexo 2), si el control de extracción (CE) se usa para monitorizar el aislamiento del ácido nucleico y como control de inhibición de la PCR, agregar 5µL del CE reconstituido a la muestra y/o mezcla de tampón de lisis. Cerrar cada tubo y agitar 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 por pocillo/reacción.

Tener en cuenta: El control positivo y negativo no deben ser extraídos. Sin embargo, para monitorizar o controlar el proceso de extracción y descartar posibles contaminaciones, se puede extraer un blanco de muestra (no suministrado en el kit) siguiendo el mismo procedimiento utilizado para la muestra clínica. El blanco de muestra debería consistir en la misma matriz (real o simulada) que las muestras clínicas, previamente caracterizado como negativo para todas las dianas.

Para la extracción de DNA a partir de 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. Se han validado los siguientes kits de extracción:

- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando Maxwell® 16 instrument (Promega).
- ZP02006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit, utilizando MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).
- US121 NX-48 Urine/Swab DNA Kit utilizando Nextractor® NX-48 (Genolution Inc.).
- MagPurix® Plant DNA Extraction Kit, empleando el equipo MagPurix® automated instrument (Zinexts Life Science Corp.).
- MagDEA® Dx SV Kit, utilizando magLEAD® 6gC o 12gC (Precision System Science)).
- NucleoSpin® RNA Virus (MACHEREY-NAGEL).
- NucleoMag® Pathogen (MACHEREY-NAGEL).

- STARMag 96x4 Universal Cartridge Kit (Seegene), empleando el equipo Microlab STAR Let automatic extraction system (Hamilton).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek).
- MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit, utilizando el KingFisher Flex System instrument (ThermoFisher).
- Qiagen Symphony Sample Preparation module con el kit Qiagen Symphony Virus Mini Kit (Qiagen).

9. Interpretación de resultados

9.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexo 1)

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 de umbral para cada canal (diana) de forma independiente por parte del usuario final. El valor umbral debe establecerse en cada ensayo. Por favor, si su equipo establece el umbral automáticamente, compruebe y verifique que se ajusta al control positivo o ajústelo manualmente. Para cada canal, seleccione el pocillo correspondiente al control positivo y fije el valor umbral dentro de la fase exponencial de la curva de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo (por debajo de la línea base). Una vez establecido el umbral, se pueden interpretar el resto de las muestras del mismo ensayo.

El valor umbral de los diferentes canales podría ser diferente debido a la naturaleza química de los diferentes fluoróforos. El valor de umbral para diferentes instrumentos puede variar debido a las diferentes intensidades de la señal.

También se recomienda incluir un blanco, que consta de una muestra negativa confirmada (la misma matriz que las muestras analizadas) para las dianas detectadas con el fin de establecer la línea de base del ensayo.

El uso de controles positivo y negativo en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en los pocillos del control negativo y la presencia de señal para *Sexual Health Panel I* en los pocillos del control positivo.

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

| Controles | Dianas detectadas ¹ | Control Interno ² | Interpretación de los controles |
|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| Control Positivo (CP) | ≤40 | ≤40 | Válido |
| Control Negativo (CN) | >40 o no señal | ≤40 | Válido |

Tabla 2. Rendimiento esperado de los controles. CI sin 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), todos los resultados se consideran "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El Control Interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación ($C_t \leq 40$) 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.

En caso de que los resultados de todos los genes diana sean negativos, el CI debe mostrar una señal de amplificación con $C_t \leq 35$. Si hay una ausencia de señal o un valor de $C_t > 35$ del control interno, el resultado se considera como "inválido", y se requiere una nueva prueba. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100, o volver a extraer y volver a realizar la prueba para verificar posibles fallas en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

Una muestra se considera positiva si el valor de C_t obtenido es ≤ 40 y el control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación ($C_t \leq 40$ o ninguna señal). En ocasiones, su detección no es necesaria porque un número elevado de copias de la diana puede provocar una amplificación preferencial de los ácidos nucleicos específicos de la diana. En caso de que una de las dianas presente un elevado número de copias, el resto de dianas permanezcan negativas, y el Control Interno no muestre señal de amplificación, no se pueden descartar falsos negativos de otras dianas. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10.

Para la interpretación de los resultados de la muestra del paciente, **seleccione solo los canales donde se detectan las dianas**. Después, use la siguiente tabla, lea y analice los resultados:

| | Mezcla de reacción | Patógenos | Canales | | | |
|---|--------------------|-----------------------|----------|-------------------|----------|-------------------|
| | | | FAM | HEX | ROX | Cy5 |
| 1 | NMT | <i>C. trachomatis</i> | Positivo | | | |
| | | <i>M. genitalium</i> | | Positivo | | |
| | | <i>N. gonorrhoeae</i> | | | Positivo | |
| | | Control Interno (CI) | | | | Positivo/Negativo |
| 2 | URE | <i>T. vaginalis</i> * | Positivo | | | |
| | | <i>U. urealyticum</i> | | Positivo | | |
| | | <i>U. parvum</i> | | | Positivo | |
| | | <i>M. hominis</i> | | | | Positivo |
| 3 | HHT | HSV-1 | Positivo | | | |
| | | Control Interno (CI) | | Positivo/Negativo | | |
| | | HSV-2 | | | Positivo | |
| | | <i>T. pallidum</i> | | | | Positivo |
| 4 | CGT | <i>T. vaginalis</i> * | Positivo | | | |
| | | Control Interno (CI) | | Positivo/Negativo | | |
| | | <i>C. albicans</i> | | | Positivo | |
| | | <i>G. vaginalis</i> | | | | Positivo |

Tabla 3. Interpretación de los resultados de muestras de pacientes. Positivo: curva de amplificación. Vacío = sin curva de amplificación.

* Cualquier espécimen de paciente que muestre una curva de amplificación para *Trichomonas vaginalis* con las mezclas de reacción URE y / o CGT debe considerarse como positivo para *Trichomonas vaginalis*.

Nota: Una muestra individual de un paciente puede ser positiva simultáneamente para más de una diana. La Tabla 3 muestra sólo los resultados más representativos que pueden esperarse con el VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit.

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; y 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:

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

NOTA: Un resultado positivo para *C. albicans* y /o *G. vaginalis*, así como para *M. hominis*, *U. parvum* y/o *U. urealyticum* no indica necesariamente infecciones urogenitales, ya que *C. albicans* y *G. vaginalis* pueden formar parte de la microbiota vaginal de mujeres sanas, mientras que *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum* pueden encontrarse en el tracto urogenital humano de individuos sanos. Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional sanitario en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas diagnósticas.

| Mezcla de reacción | | Control Negativo | Control Positivo |
|--------------------|-----|------------------|------------------|
| 1 | NMT | | |
| 2 | URE | | |
| 3 | HHT | | |

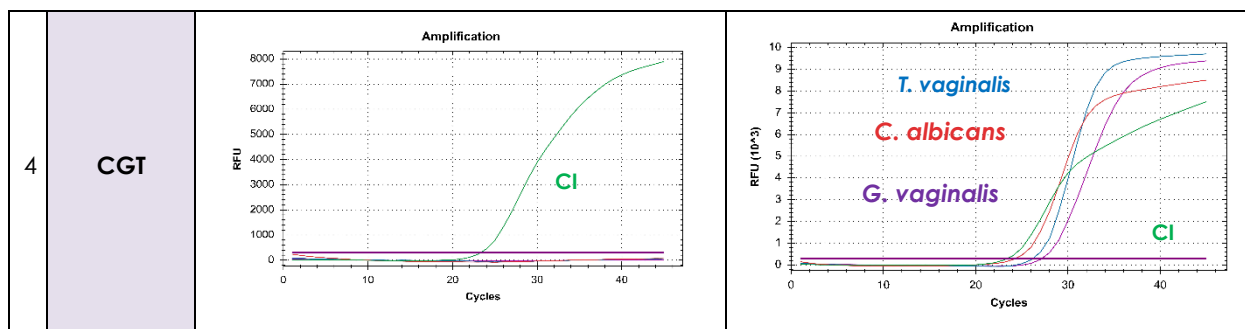


Tabla 4. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo en CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

9.2. Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexo 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 de extracción ((CE) mezcla de reacción 1NMT) y control interno (CI) para comprobar el correcto procedimiento de extracción (CE) y el 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 de umbral para cada canal (diana) de forma independiente por parte del usuario final. El valor umbral debe establecerse en cada ensayo. Por favor, si su equipo establece el umbral automáticamente, compruebe y verifique que se ajusta al control positivo o ajústelo manualmente. Para cada canal, seleccione el pocillo correspondiente al control positivo y fije el valor umbral dentro de la fase exponencial de la curva de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo (por debajo de la línea base). Una vez establecido el umbral, se pueden interpretar el resto de las muestras del mismo ensayo.

El valor umbral de los diferentes canales podría ser diferente debido a la naturaleza química de los diferentes fluoróforos. El valor de umbral para diferentes instrumentos puede variar debido a las diferentes intensidades de la señal.

También se recomienda incluir un blanco, que consiste en una muestra negativa confirmada (la misma matriz que las muestras analizadas) para las dianas detectadas con el fin de establecer la línea de base del ensayo.

El uso de controles positivo y negativo en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en los pocillos del control negativo y la presencia de señal para *Sexual Health Panel I* en los pocillos del control positivo.

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

| Controles | Dianas detectadas ¹ | Control Interno/de Extracción ² | Interpretación de los Controles |
|------------------------------|--------------------------------|--|---------------------------------|
| Control Positivo (CP) | ≤40 | ≤40 | Válido |
| Control Negativo (CN) | >40 o sin señal | ≤40 | Válido |

Tabla 5. Rendimiento esperado de los controles. Ct sin 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), todos los resultados se consideran "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El Control interno/de extracción (CI/CE) debería mostrar una señal de amplificación ($Ct \leq 40$) en los pocillos del CP y CN. Se debe añadir 1 μ L de CE al CP y al CN de 1NMT antes de empezar la qPCR (mirar sección "Protocolo PCR" del Anexo 2).

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.

En caso de que los resultados de todos los genes diana de los diferentes patógenos sean negativos, el CI/CE debe mostrar una señal de amplificación con $Ct \leq 35$. Si hay una ausencia de señal o un valor de $Ct > 35$ del control interno / de extracción, el resultado se considera como "inválido", y se requiere una nueva prueba. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100, o volver a extraer y volver a realizar la prueba para verificar posibles fallos en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

Una muestra se considera positiva si el valor de Ct es ≤ 40 y el control interno / de extracción (CI/CE) muestra o no una señal de amplificación ($Ct \leq 40$ o ninguna señal). A veces, su detección no es necesaria porque un número elevado de copias de la diana puede provocar una amplificación preferencial de los ácidos nucleicos específicos de la diana. Se pueden observar diferencias en los valores de Ct en el control de extracción entre los controles y las muestras clínicas, debido al proceso de extracción. En caso de que una de las dianas presente un número elevado de copias, el resto de las dianas permanecen negativas y el Control Interno/de Extracción no muestra señal de amplificación, no se pueden descartar falsos negativos. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10.

Para la interpretación de los resultados de la muestra del paciente, **seleccione solo los canales donde se detectan las dianas**. Después, use la siguiente tabla, lea y analice los resultados:

| | Mezcla de reacción | Patógenos | Canales | | | |
|---|--------------------|----------------------------|----------|-------------------|----------|-------------------|
| | | | FAM | HEX | ROX | Cy5 |
| 1 | 1NMT | <i>C. trachomatis</i> | Positivo | | | |
| | | <i>M. genitalium</i> | | Positivo | | |
| | | <i>N. gonorrhoeae</i> | | | Positivo | |
| | | Control de Extracción (CE) | | | | Positivo/Negativo |
| 2 | URE | <i>T. vaginalis</i> * | Positivo | | | |
| | | <i>U. urealyticum</i> | | Positivo | | |
| | | <i>U. parvum</i> | | | Positivo | |
| | | <i>M. hominis</i> | | | | Positivo |
| 3 | HHT | HSV-1 | Positivo | | | |
| | | Control Interno (CI) | | Positivo/Negativo | | |
| | | HSV-2 | | | Positivo | |
| | | <i>T. pallidum</i> | | | | Positivo |
| 4 | CGT | <i>T. vaginalis</i> * | Positivo | | | |
| | | Control Interno (CI) | | Positivo/Negativo | | |
| | | <i>C. albicans</i> | | | Positivo | |
| | | <i>G. vaginalis</i> | | | | Positivo |

Tabla 5. Interpretación de los resultados de muestras de pacientes. Positivo: Curva de amplificación. Vacío: No curva de amplificación.

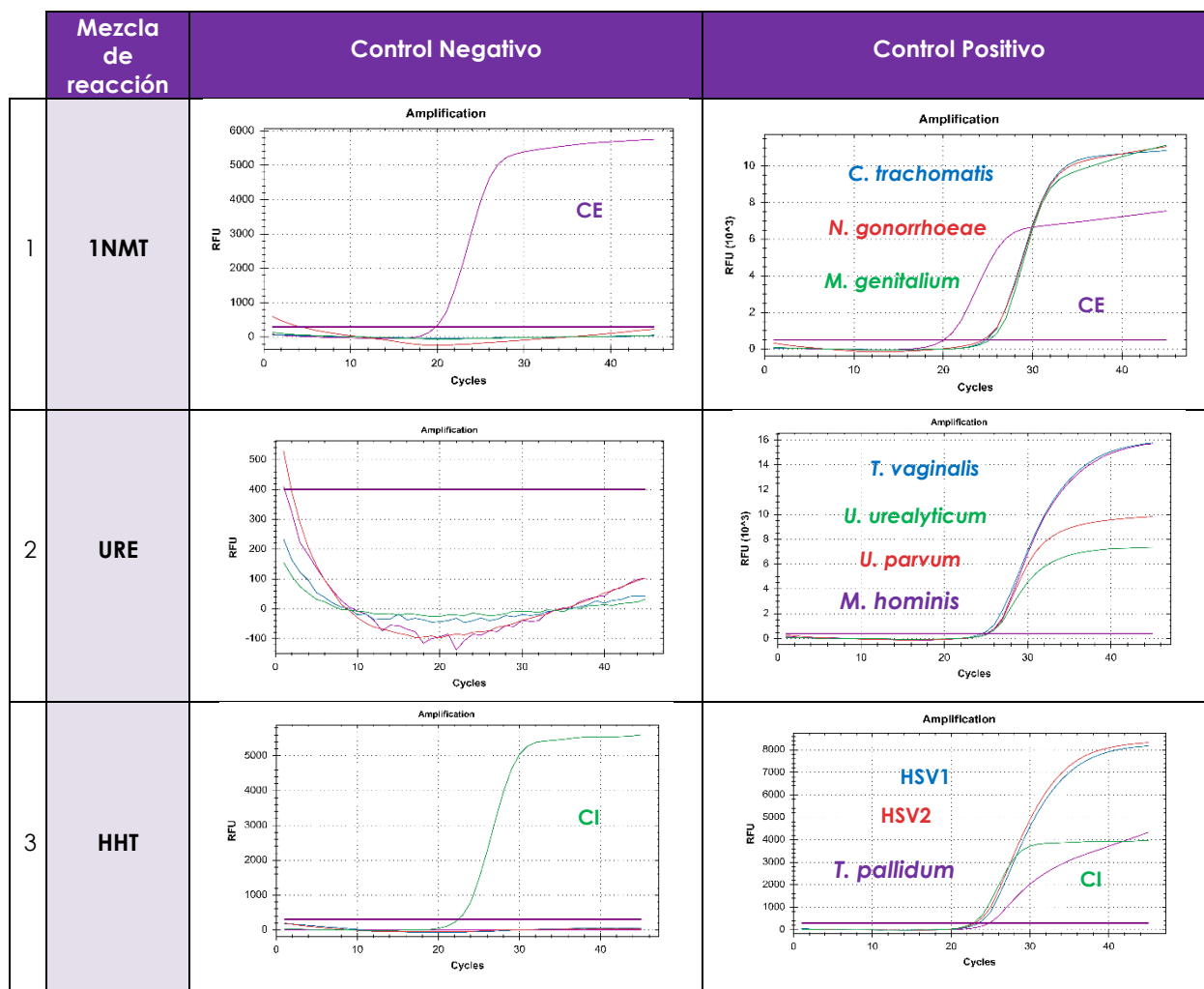
* Cualquier espécimen de paciente que muestre una curva de amplificación para *Trichomonas vaginalis* con las mezclas de reacción URE y / o CGT debe considerarse como positivo para *Trichomonas vaginalis*.

Nota: Una muestra individual de un paciente puede ser positiva simultáneamente para más de una diana. La **Tabla 5** muestra sólo los resultados más representativos que pueden esperarse con el **VIASURE Sexual Health Panel / Real Time PCR Detection Kit**.

En caso de un resultado ambiguo continuado, se recomienda revisar las instrucciones de uso y el proceso de extracción utilizado por el usuario, para verificar el correcto desempeño de cada paso de la qPCR y revisar los parámetros, y 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:

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

NOTA: Un resultado positivo para *C. albicans* y /o *G. vaginalis*, así como para *M. hominis*, *U. parvum* y/o *U. urealyticum* no indica necesariamente infecciones urogenitales, ya que *C. albicans* y *G. vaginalis* pueden formar parte de la microbiota vaginal de mujeres sanas, mientras que *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum* pueden encontrarse en el tracto urogenital humano de individuos sanos. Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional sanitario en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas diagnósticas.



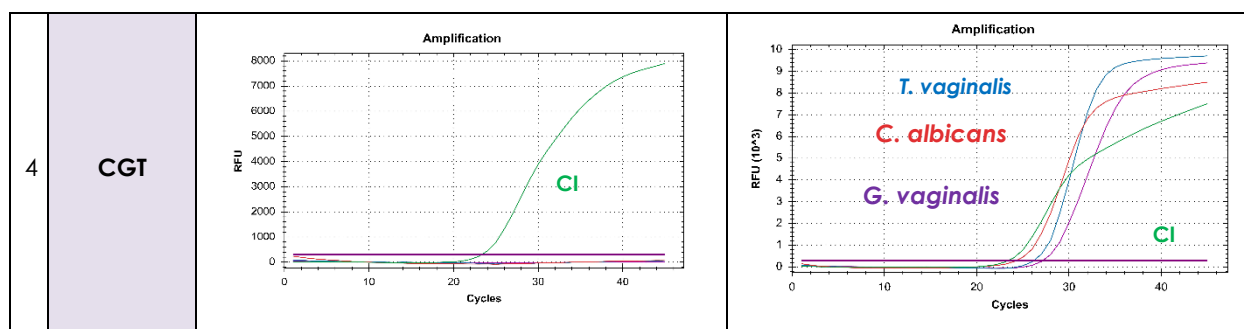


Tabla 7. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo en CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

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. Un resultado positivo para *C. albicans* y/o *G. vaginalis*, así como para *M. hominis*, *U. parvum* y/o *U. urealyticum* no indica necesariamente infecciones urogenitales, ya que *C. albicans* y *G. vaginalis* pueden formar parte de la microbiota vaginal de mujeres sanas, mientras que *M. hominis*, *U. parvum* y *U. urealyticum* pueden encontrarse en el tracto urogenital humano de individuos sanos.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de muestras del tracto genital y muestras de orina.
- El ON 0318 solo interviene en la evaluación de la conformidad del ensayo para *Chlamydia trachomatis*. El alcance de la certificación CE abarca la detección de *Chlamydia trachomatis* a partir de muestras de orina y especímenes del tracto genital. La detección de *Chlamydia trachomatis* en muestras faríngeas, de suero y rectales, quedan fuera del alcance de la certificación por el ON 0318. El resto de los patógenos tienen marcado CE de auto certificación.
- Es posible observar fenómenos “crosstalk” en canales vacíos del termociclador si no hay diana que detectar, por lo que es necesario seleccionar solo los canales donde éstas amplifiquen cuando se lleve a cabo la interpretación de resultados. Para cualquier consulta contacte con viasuresupport@certest.es.
- 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 un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. No es posible correlacionar los valores de Ct obtenidos por PCR con la concentración de la muestra, ya que dependen del termociclador utilizado y del propio experimento.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis*, HSV-1, HSV-2, *T. pallidum*, *C. albicans*, y/o *G. vaginalis*, ya sea a causa de muestras con una elevada concentración de DNA diana o por contaminación a causa de productos de la PCR de reacciones previas.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada entre el Control de Extracción y Sexual Health Panel I 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 de 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 del/los patógeno/s 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 variantes nuevas o desconocidas de *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis*, HSV-1, HSV-2, *T. pallidum*, *C. albicans*, y/o *G. vaginalis*.
 - Una carga del/los patógeno/s 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 la infección o durante el tratamiento de la misma.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables y no implica que estos microorganismos sean infecciosos 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.
 - Resultados negativos no excluyen padecer la infección, 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 óptimos y el momento en el que se alcanzan los máximos niveles durante las infecciones causadas por *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis*, HSV-1, HSV-2, *T. pallidum*, *C. albicans*, y/o *G. vaginalis*. La recolección de múltiples muestras (tipos de muestras y en varios momentos a lo largo del tiempo) del mismo paciente puede ser necesaria para detectar el/los microorganismo(s).
 - Si las pruebas de diagnóstico para 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*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis*, HSV-1, HSV-2, *T. pallidum*, *C. albicans*, y/o *G. vaginalis*, entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.
 - El Control Positivo y el Control Negativo no deben extraerse, pero se recomienda incluir una muestra de blanco durante todo el flujo de trabajo de extracción y qPCR para descartar posibles contaminaciones. Los posibles falsos positivos podrían pasar desapercibidos si se omite el blanco de muestra.
 - Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como: equipo de PCR utilizado (incluso siendo el mismo modelo), sistema de extracción, tipo de muestra, tratamiento previo de la muestra etc.... entre otros.

11. Control de calidad

VIASURE Sexual Health Panel I 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) confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del funcionamiento analítico

12.1. Linealidad analítica y Sensibilidad analítica (Límite de Detección (LoD))

La linealidad de los ensayos se determinó analizando diluciones seriadas 1:10 de concentración conocida (en el rango entre 10^7 a 10^1 copias por reacción) de DNA específico y sintético perteneciente a cada microorganismo diana detectado, en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Por otro lado, empleando el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit mostró un límite de detección de 10 DNA copias por reacción para *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum* y *M. hominis*; HSV-1, HSV-2 y *T. pallidum*; *C. albicans* y/o *G. vaginalis*.

12.2. Exactitud

12.2.1. Veracidad (Sesgo)

La veracidad de VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit fue evaluada frente al material de referencia listado a continuación.

1. The International Reagent Resource (IRR™):

| Referencia externa | Nombre del patógeno | Variedad |
|--------------------|---|-----------|
| FR-309 | Human Herpesvirus 1, Strain HF (ATCC® VR-260™) | HF |
| FR-310 | Human Herpesvirus 1, Strain KOS (ATCC® VR-1493™) | KOS |
| FR-311 | Human Herpesvirus 1, Strain MacIntyre (ATCC® VR-539™) | MacIntyre |

Tabla 19. Cepas de referencia de Herpesvirus 1 humano de IRR.

2. La Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC®"):

| Referencia externa | Nombre del patógeno | Variedad |
|--------------------|--|---|
| VR-571B | <i>Chlamydia trachomatis</i> | Trachoma type A strain HAR-13 [strain Har 13] |
| VR-573 | <i>Chlamydia trachomatis</i> | Trachoma type B strain HAR-36 |
| VR-347 | <i>Chlamydia trachomatis</i> | Apache-2 |
| VR-1477 | <i>Chlamydia trachomatis</i> | TW-3 [Trachoma type C strain TW-3] |
| VR-885 | <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar D | Trachoma type D strain UW-3/Cx |
| VR-348B | <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar E | BOUR |
| VR-346 | <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar F | IC-Cal-3 |
| VR-878 | <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar G | UW-57/Cx |
| VR-879 | <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar H | Trachoma type H strain UW-43/Cx |
| VR-880 | <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar I | UW-12/Ur |
| VR-886 | <i>Chlamydia trachomatis</i> | Trachoma type J strain UW-36/Cx |
| VR-887 | <i>Chlamydia trachomatis</i> | Trachoma type K strain UW-31/Cx |

Tabla 20. Cepas de referencia de *C. trachomatis* de ATCC.

3. La Colección Española de Cultivos Tipo (CECT):

| Referencia externa | Nombre del patógeno | Variedad |
|--------------------|-------------------------|----------|
| 1002 | <i>Candida albicans</i> | NCYC 597 |

Tabla 21. Cepas de referencia de *C. albicans* de CECT.

4. Controles

| Referencia externa | Nombre del patógeno | Variedad |
|--------------------|--|----------|
| MBC109 | AMPLIRUN® TREPONEMA PALLIDUM DNA CONTROL | - |

Tabla 22. Material de referencia de *T. pallidum* de Vircell S.L.

| Referencia externa | Nombre del patógeno | Variedad |
|--------------------|---|-----------|
| 0510006CFHI | Heat Inactivated HSV Type 2 Culture Fluid | MS |
| NATMEP-BIO | HSV-1 | MacIntyre |
| NATMEP-BIO | HSV-2 | MS |

Tabla 23. Material de referencia de HSV de ZeptoMetrix Corporation.

5. Programas EQA:

| Procedencia | Nombre del patógeno | Variedad |
|---|-------------------------------|-------------|
| QCMD 2017 Sexually Transmitted Infections I EQA Pilot Study | <i>Mycoplasma genitalium</i> | - |
| STI Evaluation Panel-01 | <i>Mycoplasma hominis</i> | - |
| STI Evaluation Panel-01 | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | - |
| QCMD 2017 Neisseria gonorrhoeae DNA EQA Programme | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | St 49226 |
| QCMD 2017 Neisseria gonorrhoeae DNA EQA Programme | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | Lvl Ng PorA |
| QCMD 2017 Sexually Transmitted Infections I EQA Pilot Study | <i>Trichomonas vaginalis</i> | - |
| STI Evaluation Panel-01 | <i>Ureaplasma urealyticum</i> | - |
| STI Evaluation Panel-01 | <i>Chlamydia trachomatis</i> | SW |
| QCMD 2017 Chlamydia trachomatis DNA EQA Programme | <i>Chlamydia trachomatis</i> | LGV |
| STI Evaluation Panel-01 | <i>Chlamydia trachomatis</i> | LGV |
| STI Evaluation Panel-01 | <i>Gardnerella vaginalis</i> | - |
| STI Evaluation Panel-01 | <i>Trichomonas vaginalis</i> | - |

Tabla 24. Material de referencia de programas EQA.

12.2.2. Precisión

Para determinar la precisión de VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit, se realizaron ensayos intra-ensayo (repetibilidad), inter-ensayo (reproducibilidad), inter-lote (precisión intermedia) y ensayos inter-termociclador (entre laboratorios) para cada mezcla de reacción que compone este panel VIASURE. Tras la realización de dichas pruebas, se verificó la conformidad de cada mezcla de reacción con los criterios inicialmente establecidos, por lo que los resultados pueden extrapolarse a VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit.

12.3. Especificidad y reactividad analítica

La especificidad y reactividad analítica se evaluaron para el producto VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit *in silico*, y empleando diferentes materiales de partida como cepas de referencia certificadas, RNA/DNAs de referencia certificados, así como material procedente de programas EQA.

12.3.1. Especificidad analítica

12.3.1.1. Reactividad cruzada y ensayo de exclusividad

Reactividad cruzada: ensayo *in silico*

La especificidad analítica (reactividad cruzada) se evaluó utilizando bases de datos de secuencias de nucleótidos disponibles públicamente y herramientas de búsqueda y/o alineación para verificar que otros genomas y microorganismos no causan amplificaciones inespecíficas en el test. Los análisis bioinformáticos mostraron que los primers y sondas seleccionados no deberían causar falsos positivos en la detección de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, *Treponema pallidum*, Herpes virus 1 y Herpes virus 2 cuando hay otros organismos presentes.

Reactividad cruzada: ensayo experimental

La especificidad analítica de VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos asociados a patógenos entéricos y genitourinarios más comunes presentes en el tracto gastrointestinal o en el sistema urogenital. No se detectó reactividad cruzada entre ninguno de los siguientes microorganismos probados, excepto los patógenos específicos de cada ensayo.

| Prueba de reactividad cruzada | | | | | |
|--|-----|--|-----|--|-----|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> Strain NCTC 7844 | - | Echovirus Type 11 | - | <i>Mycoplasma genitalium</i> (drug resistant) | -/+ |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> Strain DSM 819 | - | <i>Enterobacter aerogenes</i> serotype Cloaca B | - | <i>Mycoplasma genitalium</i> (wild type) | -/+ |
| <i>Bacteroides fragilis</i> EN-2, VPI 2553 | - | <i>Enterobacter cloacae</i> serotype Cloaca A | - | <i>Mycoplasma genitalium</i> G37 | -/+ |
| <i>Candida albicans</i> Strain NCYC 597 | -/+ | <i>Enterococcus faecalis</i> Strain NCIMB 775 | - | <i>Mycoplasma genitalium</i> M6303 (macrolide resistant) | -/+ |
| <i>Candida dubliniensis</i> Strain NRRL Y- 17841 | - | <i>Enterococcus faecium</i> Serotype 11 | - | <i>Mycoplasma genitalium</i> M6593 (macrolide resistant) | -/+ |
| <i>Candida glabrata</i> Strain NRRL Y-65 | - | Enterovirus type 71 | - | <i>Mycoplasma hominis</i> | -/+ |
| <i>Candida krusei</i> | - | Enterovirus (Echovirus 7) | - | <i>Neisseria cinerea</i> | - |
| <i>Candida parapsilosis</i> | - | Enterovirus (Coxsackie A4) | - | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | -/+ |
| <i>Candida tropicalis</i> Strain 1 | - | <i>Escherichia coli</i> Strain 0.1285; O18:H7:K1 | - | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> St 49226 | -/+ |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> (SW) | -/+ | <i>Gardnerella vaginalis</i> | -/+ | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Lvl Ng PorA | -/+ |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV) | -/+ | <i>Haemophilus ducreyi</i> class 1 | - | <i>Neisseria meningitidis</i> Serogroup A | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV2) | -/+ | <i>Haemophilus influenzae</i> Strain Minn A | - | Parechovirus types 1, 2 and 3 | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Trachoma type A strain HAR-13 [strain Har 13] | -/+ | Hepatitis A Virus | - | <i>Pneumocystis jirovecii</i> (g885652) | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Trachoma type B strain HAR-36 | -/+ | HSV-1 (clinical) | -/+ | <i>Pneumocystis jirovecii</i> (Type A1) | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Apache-2 | -/+ | HSV-1 Macintyre | -/+ | <i>Proteus mirabilis</i> Strain NCIMB 5887 | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> TW-3 [Trachoma type C strain TW-3] | -/+ | HSV-1 strain HF | -/+ | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Strain ATCC 27853 | - |

| | | | | | |
|--|-----|--|-----|--|-----|
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar D Trachoma type D strain UW-3/Cx | -/+ | HSV-1 strain KOS | -/+ | <i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>Marcescens</i> Strain NCTC 1377 | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar E BOUR | -/+ | HSV-1 (95/1906) | -/+ | <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Strain ATCC 25923 | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar F IC-Cal-3 | -/+ | HSV-2 (clinical) | -/+ | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Strain Diaz 552 | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar G UW-57/Cx | -/+ | HSV-2 MS | -/+ | <i>Streptococcus agalactiae</i> Strain Z019 | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar H Trachoma type H strain UW-43/Cx | -/+ | Human Papillomavirus types 16 and 18 | - | <i>Streptococcus pneumoniae</i> Strain Z022 | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar I UW-12/Ur | -/+ | <i>Klebsiella oxytoca</i> Strain CCUG 15717 | - | <i>Treponema phagedenis</i> | - |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Genovar F | -/+ | <i>Klebsiella pneumoniae</i> Serotype Capsular 2 | - | <i>Treponema pallidum</i> | -/+ |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Trachoma type J strain UW-36/Cx | -/+ | JC virus type 1A | - | <i>T. pallidum pertenuis</i> (Brazzaville) | -/+ |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar J | -/+ | <i>Listeria innocua</i> Serotype 6a | - | <i>Trichomonas vaginalis</i> | -/+ |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar K | -/+ | <i>Listeria ivanovii</i> Serovar 5 | - | <i>Ureaplasma parvum</i> | -/+ |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> Trachoma type K strain UW-31/Cx | -/+ | <i>Listeria monocytogenes</i> Serotype 4b | - | <i>Ureaplasma urealyticum</i> | -/+ |
| Coxsackievirus Type B3 | - | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | - | Varicella-zoster virus (Ellen) | - |
| Cytomegalovirus AD-169 | - | <i>Mycoplasma genitalium</i> | -/+ | Varicella-zoster virus (9/84) | - |
| Cytomegalovirus (clinical) | - | | | | |

Tabla 14. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

Interferencias e inhibidores de PCR

Se realizó un estudio de sustancias interferentes para comprobar el posible efecto interferente de sustancias endógenas y exógenas sobre VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit. Los resultados obtenidos permiten concluir que, a las concentraciones evaluadas, no se observan interferencias de ninguna de las sustancias testadas a las concentraciones indicadas para cada condición.

12.3.1. Reactividad analítica

Reactividad analítica: evaluación *in silico*

La reactividad analítica (inclusividad) se evaluó para comprobar que las diferentes mutaciones que puedan encontrarse no afectan a la funcionalidad del test o, en el caso de que afectase, poder tomar acciones correctivas. Los análisis bioinformáticos mostraron que los primers y sondas seleccionadas detectan correctamente las secuencias de ácido nucleico de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, *Treponema pallidum*, Herpes virus 1 y Herpes virus 2.

Reactividad analítica: evaluación experimental

La reactividad de VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit para **Sexually Transmitted Diseases Reaction Mix** (NMT y URE) se evaluó frente a DNA extraído de: *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria gonorrhoeae* cepas St 49226 y Lvl Ng PorA, *Chlamydia trachomatis* (SW, LGV y LGV2), *Chlamydia trachomatis* Genovar F,

Chlamydia trachomatis Trachoma tipo A cepa HAR-13 [strain Har 13], *Chlamydia trachomatis* Trachoma tipo B cepa HAR-36, *Chlamydia trachomatis* Apache-2, *Chlamydia trachomatis* TW-3 [Trachoma type C strain TW-3], *Chlamydia trachomatis* Serovar D Trachoma tipo D cepa UW-3/Cx, *Chlamydia trachomatis* Serovar E BOUR, *Chlamydia trachomatis* Serovar F IC-Cal-3, *Chlamydia trachomatis* Serovar G UW-57/Cx, *Chlamydia trachomatis* Serovar H Trachoma type H cepa UW-43/Cx, *Chlamydia trachomatis* Serovar I UW-12/Ur, *Chlamydia trachomatis* Trachoma tipo J cepa UW-36/Cx, *Chlamydia trachomatis* Serovar J, *Chlamydia trachomatis* Serovar K, *Chlamydia trachomatis* Trachoma tipo K cepa UW-31/Cx, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma genitalium* (resistente a fármacos), *Mycoplasma genitalium* (wild type), *Mycoplasma genitalium* G37, *Mycoplasma genitalium* M6303 y *Mycoplasma genitalium* M6593, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y *Mycoplasma hominis*, mostrando resultados positivos.

La reactividad de VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit para **Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Treponema pallidum Reaction Mix** se evaluó frente a DNA extraído de: HSV-1 (clínica), HSV-1 cepa MacIntyre, HSV-1 cepa HF, HSV-1 cepa (95/1906) y HSV-1 cepa KOS, HSV-2 (clínica), HSV-2 cepa MS, *Treponema pallidum* y *Treponema pallidum pertenue* (Brazzaville), mostrando resultados positivos.

La reactividad de VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit para **C. albicans, G. vaginalis & T. vaginalis Reaction mix** se evaluó frente a DNA extraído de *Candida albicans* cepa NCYC 597, *Gardnerella vaginalis* y *Trichomonas vaginalis*, mostrando resultados positivos.

12.4. Trazabilidad metrológica

Este dispositivo no está diseñado para fines de medición.

13. Características del funcionamiento clínico

Las características del funcionamiento clínico de VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit se probaron utilizando muestras clínicas del tracto genital y de orina procedentes de pacientes con signos y síntomas clínicos de ETS, realizando diferentes evaluaciones multicéntricas en colaboración con entidades nacionales e internacionales. 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 | Código Mezcla reacción | Diana |
|---|--|---|---|------------------------|---|
| 1 | Certest Biotec, en colaboración con el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB) y el Hospital Ernest Lluch (HEL) (Zaragoza, España) | Hisopos vaginales Hisopos genitales/urogenitales Hisopos rectales/anales Hisopos uretrales | Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex); MagDEA Dx SV kit empleando el equipo magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) | SPO1 | <i>C. trachomatis</i> <i>M. genitalium</i> <i>N. gonorrhoeae</i> <i>U. urealyticum</i> <i>U. parvum</i> <i>M. hominis</i> <i>T. vaginalis</i> |
| | Certest Biotec Zaragoza, España), en colaboración con Cerba Xpert | | MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit, empleando el equipo KingFisher Flex (Thermo Scientific) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) | | HSV-1 HSV-2 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|-------------|---|
| 2 | Certest Biotec (Zaragoza, España) | Muestras del tracto genital | Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex); MagDEA Dx SV kit empleando el equipo magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.); MagPurix® Plant DNA Extraction Kit empleando el MagPurix® (Zinexts Life Science Corp.) + CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) y AriaMx Real-time PCR System (Agilent Technologies) | CGT | <i>C. albicans</i> <i>G. vaginalis</i> <i>T. vaginalis</i> |
| 3 | Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS)(Zaragoza, España) | Hisopos de úlceras genitales | StarMag 96x4 Universal Cartridge (Seegene), empleando el Microlab STAR Let automatic extraction System (Hamilton) + Dprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) | HHT | HSV-1 HSV-2 <i>T. pallidum</i> |
| 4 | Health Service Laboratories (Londres, Reino Unido) | Hisopos clínicos urogenitales Orina Muestras clínicas urogenitales ThinPrep | Qiagen Symphony Virus Mini Kit empleando el equipo automatizado Qiagen Symphony Sample Preparation module + Rotor-Gene Q (Qiagen) | SP01 | <i>C. trachomatis</i> <i>N. gonorrhoeae</i> <i>U. urealyticum</i> <i>U. parvum</i> <i>G. vaginalis</i> <i>M. genitalium</i> <i>T. vaginalis</i> HSV-1 HSV-2 |

Tabla 8. Resumen de los centros, tipos de muestra y flujo de trabajo llevado a cabo durante las evaluaciones clínicas.

Los valores positivos y negativos, falsos positivos y negativos, sensibilidad, especificidad, valores PPV y NPV para VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit se calcularon en relación con cada ensayo comparador, tal como se muestra en la siguiente tabla:

| Lugar | Ensayo comparador | Tipo de muestra | Diana | TP | TN | FP | FN | Sensibilidad | Especificidad | PPV | NPV |
|-------|------------------------|---------------------------------|-----------------------|----|-----|----|----|--------------|---------------|------------|---------------|
| 1 | Método de referencia * | Todos los tipos | <i>C. trachomatis</i> | 43 | 274 | 0 | 0 | 1 (0,91-1) | 1 (0,98-1) | 1 (0,91-1) | 1 (0,98-1) |
| | | Hisopos vaginales | | 5 | 80 | 0 | 0 | 1 (0,47-1) | 1 (0,95-1) | 1 (0,47-1) | 1 (0,95-1) |
| | | Hisopos genitales/ urogenitales | | 37 | 102 | 0 | 0 | 1 (0,90-1) | 1 (0,96-1) | 1 (0,90-1) | 1 (0,96-1) |
| | | Todos los tipos | <i>M. genitalium</i> | 3 | 313 | 1 | 0 | 1 (0,29-1) | 0,99 (0,98-1) | 1 (0,29-1) | 0,99 (0,98-1) |
| | | Hisopos genitales/ urogenitales | | 3 | 135 | 1 | 0 | 1 (0,29-1) | 0,99 (0,96-1) | 1 (0,29-1) | 0,99 (0,96-1) |
| | | Todos los tipos | <i>N. gonorrhoeae</i> | 12 | 305 | 0 | 0 | 1 (0,73-1) | 1 (0,98-1) | 1 (0,73-1) | 1 (0,98-1) |
| | | Hisopos vaginales | | 1 | 84 | 0 | 0 | 1 (0,02-1) | 1 (0,95-1) | 1 (0,02-1) | 1 (0,95-1) |
| | | Hisopos genitales/ urogenitales | | 2 | 137 | 0 | 0 | 1 (0,15-1) | 1 (0,97-1) | 1 (0,15-1) | 1 (0,97-1) |
| | | Hisopos rectales/anales | | 1 | 37 | 0 | 0 | 1 (0,02-1) | 1 (0,90-1) | 1 (0,02-1) | 1 (0,90-1) |
| | | Hisopos uretrales | | 8 | 18 | 0 | 0 | 1 (0,63-1) | 1 (0,81-1) | 1 (0,63-1) | 1 (0,81-1) |

| | | | | | | | | | | | |
|-------------------|--|-----------------------------|--|-----|-----|---|------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Métodos moleculares de referencia ** | Todos los tipos | <i>T. vaginalis</i> | 17 | 300 | 0 | 0 | 1 (0,80-1) | 1 (0,98-1) | 1 (0,80-1) | 1 (0,98-1) |
| | | Hisopos vaginales | | 15 | 70 | 0 | 0 | 1 (0,78-1) | 1 (0,94-1) | 1 (0,78-1) | 1 (0,94-1) |
| | | Hisopos urogenitales | | 2 | 137 | 0 | 0 | 1 (0,15-1) | 1 (0,97-1) | 1 (0,15-1) | 1 (0,97-1) |
| | | Todos los tipos | <i>U. urealyticum</i> | 18 | 297 | 1 | 1 | 0,94 (0,74-0,99) | 0,99 (0,98-1) | 0,94 (0,74-0,99) | 0,99 (0,98-1) |
| | | Hisopos vaginales | | 5 | 80 | 0 | 0 | 1 (0,47-1) | 1 (0,95-1) | 1 (0,47-1) | 1 (0,95-1) |
| | | Hisopos urogenitales | | 10 | 128 | 1 | 0 | 1 (0,69-1) | 0,99 (0,95-1) | 1 (0,69-1) | 0,99 (0,95-1) |
| | | Todos los tipos | <i>U. parvum</i> | 58 | 258 | 1 | 0 | 1 (0,93-1) | 0,99 (0,97-1) | 1 (0,93-1) | 0,99 (0,97-1) |
| | | Hisopos vaginales | | 20 | 65 | 0 | 0 | 1 (0,83-1) | 1 (0,94-1) | 1 (0,83-1) | 1 (0,94-1) |
| | | Hisopos urogenitales | | 23 | 115 | 1 | 0 | 1 (0,85-1) | 0,99 (0,95-1) | 1 (0,85-1) | 0,99 (0,95-1) |
| | | Todos los tipos | <i>M. hominis</i> | 31 | 286 | 0 | 0 | 1 (0,88-1) | 1 (0,98-1) | 1 (0,88-1) | 1 (0,98-1) |
| | | Hisopos vaginales | | 12 | 73 | 0 | 0 | 1 (0,73-1) | 1 (0,95-1) | 1 (0,73-1) | 1 (0,95-1) |
| | | Hisopos urogenitales | | 17 | 122 | 0 | 0 | 1 (0,80-1) | 1 (0,97-1) | 1 (0,77-1) | 1 (0,97-1) |
| | Métodos moleculares de referencia ** | Todos los tipos | HSV1 | 105 | 211 | 0 | 1 | 0,99 (0,94-1) | 1 (0,98-1) | 0,99 (0,94-1) | 1 (0,98-1) |
| | | Hisopos anales | | 24 | 14 | 0 | 0 | 1 (0,85-1) | 1 (0,76-1) | 1 (0,85-1) | 1 (0,76-1) |
| | | Hisopos genitales | | 46 | 93 | 0 | 0 | 1 (0,92-1) | 1 (0,96-1) | 1 (0,92-1) | 1 (0,96-1) |
| | | Hisopos uretrales | | 10 | 16 | 0 | 0 | 1 (0,69-1) | 1 (0,79-1) | 1 (0,69-1) | 1 (0,79-1) |
| | | Hisopos vaginales | | 25 | 59 | 0 | 1 | 0,96 (0,80-0,99) | 1 (0,93-1) | 0,96 (0,80-0,99) | 1 (0,93-1) |
| | | Todos los tipos | HSV2 | 91 | 97 | 0 | 1 | 0,989 (0,94-1) | 1 (0,98-1) | 0,989 (0,94-1) | 1 (0,98-1) |
| | | Hisopos anales | | 15 | 23 | 0 | 0 | 1 (0,78-1) | 1 (0,85-1) | 1 (0,78-1) | 1 (0,85-1) |
| | | Hisopos genitales | | 47 | 91 | 0 | 1 | 0,97 (0,88-1) | 1 (0,96-1) | 0,97 (0,88-1) | 1 (0,96-1) |
| Hisopos uretrales | | 8 | | 18 | 0 | 0 | 1 (0,63-1) | 1 (0,81-1) | 1 (0,63-1) | 1 (0,81-1) | |
| Hisopos vaginales | | 21 | | 64 | 0 | 0 | 1 (0,83-1) | 1 (0,94-1) | 1 (0,83-1) | 1 (0,94-1) | |
| 2 | Microscopía + Cultivo | Muestras del tracto genital | <i>C. albicans</i> <i>G. vaginalis</i> <i>T. vaginalis</i> | 179 | 48 | 3 | 2 | 0,98 (0,95-0,99) | 0,94 (0,82-0,98) | 0,98 (0,94-0,99) | 0,96 (0,85-0,99) |
| | Cultivo en medio Diamond's TYI + FTD STD9 (Fast Track Diagnostics) | | <i>T. vaginalis</i> | 54 | 177 | 1 | 0 | 1 (0,91-1) | 0,99 (0,96-0,99) | 0,98 (0,89-0,99) | 1 (0,97-1) |
| | Cultivo en Sabouraud dextrose agar | | <i>C. albicans</i> | 88 | 142 | 0 | 2 | 0,97 (0,91-0,99) | 1 (0,96-1) | 1 (0,94-1) | 0,98 (0,94-0,99) |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---------------------------------|---------------------|-----|-----|---|---|---------------|-----------------|-------------------------|-------------------------|--|--|--|--|--|--|
| | con 61loranfenicol + microscopía | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Frotis de tinción de Gram | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | Allplex™ Genital Ulcer Assay (Seegene) | Hisopos de úlceras genitales | <i>G. vaginalis</i> | 152 | 78 | 2 | 0 | 1 (0,96-1) | 0,97 (0,9-0,99) | 0,98 (0,94- 0,99) | 1 (0,94- 1) | | | | | | |
| | | | HSV1 | 52 | 208 | 0 | 1 | 0,98 (0,89-1) | 1 (0,98-1) | 1 (0,91- 1) | 0,99 (0,96- 0,99) | | | | | | |
| | | | HSV2 | 54 | 206 | 1 | 0 | 1 (0,93-1) | 0,99 (0,97-1) | 0,98 (0,89- 0,99) | 1 (0,97- 1) | | | | | | |
| | | | <i>T. pallidum</i> | 31 | 230 | 0 | 0 | 1 (0,88-1) | 1 (0,98-1) | 1 (0,85- 1) | 1 (0,97- 1) | | | | | | |

Tabla 16. Valores positivo y negativo verdaderos, valores positivo y negativo falsos, sensibilidad, especificidad, valores PPV y NPV para VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit.

* Método de referencia: Combinación de varias técnicas convencionales (métodos de cultivo, visualización directa mediante microscopía) y de métodos moleculares: Allplex™ STI Essential Assay (Seegene); Chlamydia trachomatis PCR Kit (GeneProof); LightCycler® HSV 1/2 Qual Kit (Roche Diagnostics); HSV1, HSV2, VZV R-gene® (bioMérieux); Abbott RealTime CT/NG assay (Abbott).

** Métodos moleculares de referencia: LightCycler-HSV 1/2 Qual Kit molecular assay (Roche Diagnostics); y HSV1, HSV2, VZV R-gene® (bioMérieux).

Los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos durante el estudio observacional comparativo-retrospectivo realizado en Health Service Laboratories (Londres, Reino Unido), en comparación con el método de rutina (FTD STD9 (Fast Track Diagnostics)), fueron los siguientes:

| Especificidad (VIASURE vs. FTD STD9) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|------------------------------|--------|------------------------------|--------|---------------------------------|--------|------------------------------|--------|------------------------------|--------|------------------------------|--------|---------|--------|---------|--------|--------------|
| Tipo de Muestra | <i>Chlamydia trachomatis</i> | | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | | <i>Ureaplasma (UU & UP)</i> | | <i>Gardnerella vaginalis</i> | | <i>Mycoplasma genitalium</i> | | <i>Trichomonas vaginalis</i> | | HSV I | | HSV II | | Total SP (%) |
| | n Tests | SP (%) | n Tests | SP (%) | n Tests | SP (%) | n Tests | SP (%) | n Tests | SP (%) | n Tests | SP (%) | n Tests | SP (%) | n Tests | SP (%) | |
| Orina | 48 | 100 | 55 | 100 | 39 | 97.5 | 40 | 87 | 50 | 100 | 56 | 100 | 60 | 100 | 55 | 100 | 98.3 |
| Hisopo | 57 | 100 | 58 | 100 | 40 | 97.6 | 37 | 64.9 | 56 | 100 | 64 | 100 | 62 | 100 | 57 | 100 | 95.4 |
| ThinPrep | 29 | 100 | 33 | 100 | 13 | 100 | 15 | 83 | 26 | 100 | 32 | 100 | 30 | 100 | 26 | 100 | 98.6 |

Tabla 25. Especificidad de VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit obtenida del estudio observacional comparativo-retrospectivo realizado en Health Service Laboratories. SP = Especificidad; n = número.

| Sensibilidad (VIASURE vs. FTD STD9) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|------------------------------|--------|------------------------------|--------|---------------------------------|--------|------------------------------|--------|------------------------------|--------|------------------------------|--------|----------|--------|----------|--------|--------------|
| Tipo de Muestra | <i>Chlamydia trachomatis</i> | | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | | <i>Ureaplasma (UU & UP)</i> | | <i>Gardnerella vaginalis</i> | | <i>Mycoplasma genitalium</i> | | <i>Trichomonas vaginalis</i> | | HSV I | | HSV II | | Total SE (%) |
| | n sample | SE (%) | n sample | SE (%) | n sample | SE (%) | n sample | SE (%) | n sample | SE (%) | n sample | SE (%) | n sample | SE (%) | n sample | SE (%) | |
| Orina | 16 | 93.8 | 8 | 87.5 | 23 | 100 | 21 | 95.2 | 12 | 75 | 5 | 100 | 2 | 100 | 7 | 85.7 | 93.3 |
| Hisopo | 10 | 100 | 10 | 100 | 27 | 100 | 30 | 100 | 11 | 90.9 | 3 | 100 | 5 | 100 | 10 | 100 | 99.1 |
| ThinPrep | 3 | 100 | 0 | n.a. | 19 | 100 | 18 | 88.9 | 12 | 100 | 1 | 100 | 3 | 100 | 6 | 83.3 | 95.2 |

Tabla 26. Sensibilidad de VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit obtenida del estudio observacional comparativo-retrospectivo realizado en Health Service Laboratories. SE = Sensibilidad; n = número.

Los resultados muestran una alta concordancia para detectar *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis*, HSV-1, HSV-2, *T. pallidum*, *C. albicans*, y/o *G. vaginalis* utilizando VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit.

ANEXO 1

OPEN FORMAT CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

| PRODUCTO | REFERENCIA |
|--|------------|
| VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile | VS-SP0112L |
| VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile | VS-SP0112H |
| VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile | VS-SP0113L |
| VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile | VS-SP0113H |

Tabla A1. 1. Referencias

A1.1 Procedimiento

VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón y polimerasa) en formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Las posiciones de la mezcla de reacción en cada pocillo de la tira de 8 pocillos del **Sexual Health Panel I** (SP01) permiten la detección de los patógenos diana específicos a través de genes específicos en los siguientes canales (Tabla A1.2):


| | Código | Diana | Canal | Gen | |
|---|--------|-------|-------------------------------|------|---|
|  | 1 | NMT | <i>Chlamydia trachomatis</i> | FAM | ORF2 del plásmido clamidial |
| | | | <i>Mycoplasma genitalium</i> | HEX* | <i>mgPa</i> |
| | | | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | ROX | <i>porA</i> y <i>opA</i> |
| | | | Control Interno (CI) | Cy5 | - |
| | 2 | URE | <i>Trichomonas vaginalis</i> | FAM | Secuencia repetida de 2 kb de <i>T. vaginalis</i> |
| | | | <i>Ureaplasma urealyticum</i> | HEX* | <i>ure</i> |
| | | | <i>Ureaplasma parvum</i> | ROX | <i>ure</i> |
| | | | <i>Mycoplasma hominis</i> | Cy5 | <i>yidC</i> |
| | 3 | HHT | HSV-1 | FAM | <i>US4</i> |
| | | | Control Interno (CI) | HEX* | - |
| | | | HSV-2 | ROX | <i>US6</i> |
| | | | <i>Treponema pallidum</i> | Cy5 | <i>16S rRNA</i> |
| | 4 | CGT | <i>Trichomonas vaginalis</i> | FAM | Secuencia repetida de 2 kb de <i>T. vaginalis</i> |
| | | | Control Interno (CI) | HEX* | - |
| | | | <i>Candida albicans</i> | ROX | <i>5,8S rRNA</i> |
| | | | <i>Gardnerella vaginalis</i> | Cy5 | <i>16S rRNA</i> |

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.certest.es. Tenga en cuenta que el primer pocillo está marcado con un agujero en la esquina superior derecha.

A1.2 Reactivos suministrados

VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A1.3 y A1.4. 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 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. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

| Reactivo/Material | Descripción | Rango de Concentración | Color | Cantidad |
|--|--|---|-------------------|---------------------------|
| <i>Sexual Health Panel I</i> 8-well strips | Lioprotectores y estabilizadores | ± 6 g/100 mL* | Blanco (Opaco) | 12 tiras de 8 pocillos |
| | Trifosfato de nucleótido (dNTPs) | ± 1 mM* | | |
| | Primers y sondas | 0,2-1 nMol/ μ L* | | |
| | Enzimas | 10-100 U/rxn* | | |
| Rehydration Buffer | Mezcla de solución salina | ± 13 mM | Azul | 1 vial x 1,8 mL |
| | Tampon (TRIS, pH) | ± 67 mM | | |
| <i>Sexual Health Panel I</i> Positive Control | DNA sintético liofilizado no infeccioso | 1,9x10 ⁴ copias/ μ L* | Rojo | 1 vial |
| Negative control | Agua libre de RNAsa/DNAsa | 1 g/mL | Violeta | 1 vial x 1 mL |
| Water RNase/DNase free | Agua libre de RNAsa/DNAsa | 1 g/mL | 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. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-SP0112L y VS-SP0112H.

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

| Reactivo/Material | Descripción | Rango de Concentración | Color | Cantidad |
|--|--|---|-------------------|--------------------------|
| <i>Sexual Health Panel I</i> 96-well plate | Lioprotectores y estabilizadores | ± 6 g/100 mL* | Blanco (Opaco) | 1 placa |
| | Trifosfato de nucleótido (dNTPs) | ± 1 mM* | | |
| | Primers y sondas | 0,2-1 nMol/ μ L* | | |
| | Enzimas | 10-100 U/rxn* | | |
| Rehydration Buffer | Mezcla de solución salina | ± 13 mM | Azul | 1 vial x 1,8 mL |
| | Tampon (TRIS, pH) | ± 67 mM | | |
| <i>Sexual Health Panel I</i> Positive Control | DNA sintético liofilizado no infeccioso | 1,9x10 ⁴ copias/ μ L* | Rojo | 1 vial |
| Negative control | Agua libre de RNAsa/DNAsa | 1 g/mL | Violeta | 1 vial x 1 mL |
| Water RNase/DNase free | Agua libre de RNAsa/DNAsa | 1 g/mL | 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 *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-SP0113L y VS-SP0113H.

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

A1.3 Procedimiento del test

A1.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *Sexual Health Panel I* 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 *Sexual Health Panel I* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 400 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.

Nota: En caso de que el número de reacciones requeridas/necesarias sea inferior al suministrado en una tira o placa, antes de retirar el precinto protector, recorte con cuidado los pocillos necesarios y guarde el resto dentro de la bolsa con el desecante. Retire el precinto protector de aluminio de las tiras o placa que necesite para el ensayo. **Asegúrese de colocar la tira en la dirección correcta (Tabla A1. 2). El primer pocillo está marcado con un agujero en la esquina superior derecha.**

- 1) Reconstituir el número de tiras que sean necesarias.

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 *Sexual Health Panel I* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) en los pocillos correspondientes y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 1) Configurar el termociclador (consultar la compatibilidad del termociclador en la página 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 | Desnaturalización inicial | 2 min | 95°C |
| 45 | Desnaturalización | 10 seg | 95°C |
| | Hibridación/Elongación (Recogida de datos*) | 50 seg | 60°C |

Tabla A1. 5. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM, ROX, Cy5 y/o HEX como se indica en la Tabla A1.2. Dependiendo del equipo utilizado, seleccione en el

termociclador solo los canales donde se detecten las dianas (para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

ANEXO 2

OPEN FORMAT CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

| PRODUCTO | REFERENCIA |
|--|-------------|
| VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile | VS-SP0112LE |
| VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile | VS-SP0112HE |
| VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile | VS-SP0113LE |
| VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile | VS-SP0113HE |

Tabla A2. 1. Referencias.

A2.1 Procedimiento

VIASURE Sexual Health Panel I 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 y 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.

Las posiciones de la mezcla de reacción en cada pocillo de la tira de 8 pocillos del **Sexual Health Panel I** (SP01) permiten la detección de los patógenos diana específicos a través de genes específicos en los siguientes canales (Tabla A2.2):

| | Código | Diana | Canal | Gen |
|---|--------|-------------------------------|-------|---|
| 1 | 1NMT | <i>Chlamydia trachomatis</i> | FAM | ORF2 del plásmido clamidial |
| | | <i>Mycoplasma genitalium</i> | HEX* | <i>mgPa</i> |
| | | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | ROX | <i>porA</i> y <i>opA</i> |
| | | Control de Extracción (CE) | Cy5 | - |
| 2 | URE | <i>Trichomonas vaginalis</i> | FAM | Secuencia repetida de 2 kb de <i>T. vaginalis</i> |
| | | <i>Ureaplasma urealyticum</i> | HEX* | <i>ure</i> |
| | | <i>Ureaplasma parvum</i> | ROX | <i>ure</i> |
| | | <i>Mycoplasma hominis</i> | Cy5 | <i>yidC</i> |
| 3 | HHT | HSV-1 | FAM | <i>US4</i> |
| | | Control Interno (CI) | HEX* | - |
| | | HSV-2 | ROX | <i>US6</i> |
| | | <i>Treponema pallidum</i> | Cy5 | <i>16S rRNA</i> |
| 4 | CGT | <i>Trichomonas vaginalis</i> | FAM | Secuencia repetida de 2 kb de <i>T. vaginalis</i> |
| | | Control Interno (CI) | HEX* | - |
| | | <i>Candida albicans</i> | ROX | <i>5,8S rRNA</i> |
| | | <i>Gardnerella vaginalis</i> | Cy5 | <i>16S rRNA</i> |

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.certest.es. Tenga en cuenta que el primer pocillo está marcado con un agujero en la esquina superior derecha.

A2.2 Reactivos suministrados

VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A2.3 y A2.4. 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 A2.3 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A2.4 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

| Reactivo/Material | Descripción | Rango de Concentración | Color | Cantidad |
|---|--|-----------------------------------|-------------------|---------------------------|
| Sexual Health Panel I 8-well strips § | Lioprotectores y estabilizadores | ±6 g/100 mL* | Blanco (Opaco) | 12 tiras de 8 pocillos |
| | Trifosfato de nucleótido (dNTPs) | ±1 mM* | | |
| | Primers y sondas | 0,2-1 nMol/μL* | | |
| | Enzimas | 10-100 U/rxn* | | |
| Rehydration Buffer | Mezcla de solución salina | ±13 mM | Azul | 1 vial x 1,8 mL |
| | Tampon (TRIS, pH) | ±67 mM | | |
| Sexual Health Panel I Positive Control | DNA sintético liofilizado no infeccioso | 1,9x10 ⁴ copias/μL* | Rojo | 1 vial |
| Extraction Control | Ácido nucleico liofilizado no infeccioso | 2x10 ⁴ copias/μL* | Verde | 1 vial |
| Negative control | Agua libre de RNAsa/DNAsa | 1 g/mL | Violeta | 1 vial x 1 mL |
| Water RNase/DNase free | Agua libre de RNAsa/DNAsa | 1 g/mL | 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 A2. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-SP0112LE y VS-SP0112HE.

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

§ Todas las mezclas de reacción de VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit (Ref: VS-SP0112LE y VS-SP0112HE) contienen Cl, excepto la mezcla de reacción NMT.

| Reactivo/Material | Descripción | Rango de Concentración | Color | Cantidad |
|---|--|-----------------------------------|-------------------|--------------------------|
| Sexual Health Panel I 96-well plate § | Lioprotectores y estabilizadores | ±6 g/100 mL* | Blanco (Opaco) | 1 placa |
| | Trifosfato de nucleótido (dNTPs) | ±1 mM* | | |
| | Primers y sondas | 0,2-1 nMol/μL* | | |
| | Enzimas | 10-100 U/rxn* | | |
| Rehydration Buffer | Mezcla de solución salina | ±13 mM | Azul | 1 vial x 1,8 mL |
| | Tampon (TRIS, pH) | ±67 mM | | |
| Sexual Health Panel I Positive Control | DNA sintético liofilizado no infeccioso | 1,9x10 ⁴ copias/μL* | Rojo | 1 vial |
| Extraction Control | Ácido nucleico liofilizado no infeccioso | 2x10 ⁴ copias/μL* | Verde | 1 vial |
| Negative control | Control negativo | 1 g/mL | Morado | 1 vial x 1 mL |
| Water RNase/DNase free | Agua libre de RNAsa/DNAsa | 1 g/mL | 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 A2. 4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-SP0113LE y VS-SP0113HE.

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

§ Todas las mezclas de reacción de VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit (Ref: VS-SP0113LE y VS-SP0113HE) contienen CI, excepto la mezcla de reacción NMT.

A2.3 Procedimiento del test

A2.3.1 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 *Sexual Health Panel I* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A2.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *Sexual Health Panel I* 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 *Sexual Health Panel I* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 400 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.

A2.3.3 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.

Nota: En caso de que el número de reacciones requeridas/necesarias sea inferior al suministrado en una tira o placa, antes de retirar el precinto protector, recorte con cuidado los pocillos necesarios y guarde el resto dentro de la bolsa con el desecante. Retire el precinto protector de aluminio de las tiras que necesite para el ensayo.

Asegúrese de colocar la tira en la dirección correcta (Tabla A2.2). El primer pocillo está marcado con un agujero en la esquina superior derecha.

- 1) Reconstituir el número de tiras que sean necesarias.

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 correspondientes de la tira reservados para el control negativo.

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

Añadir 5 µL de *Sexual Health Panel I* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

Añadir 1µL de Control de Extracción (CE, vial verde) en los pocillos de Control Positivo y de Control Negativo de la mezcla de reacción NMT (1NMT).

Si el CE se utiliza sólo como control de la inhibición de la PCR, añadir 1 µL del CE (vial verde) a cada pocillo de NMT reaction mix (1NMT) con muestra.

Cerrar los pocillos con las tapas provistas. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (consultar la compatibilidad del termociclador en la página 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 | Desnaturalización inicial | 2 min | 95°C |
| 45 | Desnaturalización | 10 seg | 95°C |
| | Hibridación/Elongación (Recogida de datos*) | 50 seg | 60°C |

Tabla A2. 5. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM, ROX, Cy5 y/o HEX como se indica en la Tabla A2.2. Dependiendo del equipo utilizado, seleccione en el termociclador solo los canales donde se detecten las dianas (para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es).

Bibliography/Bibliografía











1. CDC. (2021a). *Gonococcal Infections Among Adolescents and Adults*. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines. <https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/gonorrhea-adults.htm>
2. CDC. (2021b). *Mycoplasma genitalium*. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines. <https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/mycoplasmagenitalium.htm>
3. Cole, S. (2020). Herpes Simplex Virus: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Nursing Clinics of North America*, 55(3), 337–345. <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2020.05.004>
4. Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y., & Dhama, K. (2018). *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis*, 117, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.028>
5. Denning, D. W., Kneale, M., Sobel, J. D., & Rautemaa-Richardson, R. (2018). Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(11), e339–e347. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30103-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30103-8)
6. Gnanadurai, R., & Fifer, H. (2020). *Mycoplasma genitalium*: A review. *Microbiology*, 166, 21–29. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000830>
7. Horner, P., Donders, G., Cusini, M., Gomberg, M., Jensen, J. S., & Unemo, M. (2018). Should we be testing for urogenital *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* and *U. urealyticum* in men and women? – a Position Statement from the European STI Guidelines Editorial Board. *J Eur Acad Dermatol Venereol.*, 32(11), 1845–1851. <https://doi.org/10.1111/jdv.15146>
8. Huai, P., Li, F., Chu, T., Liu, D., Liu, J., & Zhang, F. (2020). Prevalence of genital *Chlamydia trachomatis* infection in the general population: A meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 20(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S12879-020-05307-W/FIGURES/3>
9. Jeanmonod, R., & Jeanmonod, D. (2021). *Vaginal Candidiasis* (Updated 2021 Jul 21). In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459317/>
10. Jensen, J. S., Cusini, M., Gomberg, M., Moi, H., Wilson, J., & Unemo, M. (2022). 2021 European guideline on the management of *Mycoplasma genitalium* infections. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 36, 641–650. <https://doi.org/10.1111/jdv.17972>
11. 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>
12. Korich, F., Reddy, N., & Trent, M. (2020). *Mycoplasma genitalium* and *Trichomonas vaginalis*: Addressing Disparities and Promoting Public Health Control of Two Emerging Sexually Transmitted Infections. *Curr Opin Pediatr.*, 32(4), 482–488. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000909.Mycoplasma>
13. Margolis, E., & Fredricks, D. N. (2014). Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria. In *Molecular Medical Microbiology: Second Edition* (Vol. 3). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00083-4>
14. Minaya, M. A., Jensen, T. L., Goll, J. B., Korom, M., Datla, S. H., Belshe, R. B., & Morrison, L. A. (2017). Molecular Evolution of Herpes Simplex Virus 2 Complete Genomes: Comparison between Primary and Recurrent Infections GENETIC DIVERSITY AND EVOLUTION crossm. *American Society for Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JVI>
15. Młynarczyk-Bonikowska, B., Majewska, A., Malejczyk, M., Młynarczyk, G., & Majewski, S. (2020). Multiresistant *Neisseria gonorrhoeae*: a new threat in second decade of the XXI century. *Medical Microbiology and Immunology*, 209, 95–108. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00651-4>
16. Mohseni M, Sung S, & Takov V. (2023). Chlamydia. In *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL) (pp. 1–16).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537286/>

17. Molenaar, M. C., Singer, M., & Ouburg, S. (2018). The two-sided role of the vaginal microbiome in Chlamydia trachomatis and Mycoplasma genitalium pathogenesis. *Journal of Reproductive Immunology*, *130*, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2018.08.006>
18. Muzny, C. A., Taylor, C. M., Swords, W. E., Tamhane, A., Chattopadhyay, D., Cerca, N., & Schwebke, J. R. (2019). An Updated Conceptual Model on the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis. *The Journal of Infectious Diseases*, *220*(9), 1399–1405. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz342>
19. Muzny, C. A., Van Gerwen, O. T., & Kissinger, P. (2020). Updates in Trichomonas Treatment including Persistent Infection and 5-Nitroimidazole Hypersensitivity. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *33*(1), 73–77. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000618>
20. Posse, T., Prieto, M., Cipolla, L., & Kaufman, S. (2018). Bacteriemia por Mycoplasma hominis: un agente etiológico subestimado. *Revista Argentina de Microbiología*, *50*(1), 45–47. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.02.009>
21. Radolf, J. D., Deka, R. K., Anand, A., Šmajš, D., Norgard, M. V., & Yang, X. F. (2016). Treponema pallidum, the syphilis spirochete: making a living as a stealth pathogen. *Nature Reviews. Microbiology*, *14*(12), 744. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO.2016.141>
22. Rodríguez-Granger, J., Espadafor López, B., Cobo, F., Blasco Morente, G., Sampedro Martínez, A., Tercedor Sánchez, J., Aliaga-Martínez, L., Padilla-Malo de Molina, A., & Navarro-Marí, J. M. (2020). Update on the Diagnosis of Sexually Transmitted Infections. *Actas Dermo-Sifilograficas*, *111*(9), 711–724. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2019.05.008>
23. Rufo, D. G., Sánchez, E. G., Sánchez, J. E. G., & Moro, M. G. (2021). Clinical implications of the genus mycoplasma. *Revista Espanola de Quimioterapia*, *34*(3), 169–184. <https://doi.org/10.37201/req/014.2021>
24. Romyantseva, T., Khayrullina, G., Guschin, A., & Donders, G. (2019). Prevalence of Ureaplasma spp. and Mycoplasma hominis in healthy women and patients with flora alterations. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *93*(3), 227–231. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.001>
25. Sharifi-Rad, J., Quispe, C., Rahavian, A., Pereira Carneiro, J. N., Rocha, J. E., Alves Borges Leal, A. L., Bezerra Morais Braga, M. F., Melo Coutinho, H. D., Ansari Djafari, A., Alarcón-Zapata, P., Martorell, M., Antika, G., Tumer, T. B., Cruz-Martins, N., Helon, P., Paprocka, P., Koch, W., Docea, A. O., & Calina, D. (2021). Bioactive Compounds as Potential Agents for Sexually Transmitted Diseases Management: A Review to Explore Molecular Mechanisms of Action. *Frontiers in Pharmacology*, *12*(August), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.674682>
26. Springer, C., & Salen, P. (2023). Gonorrhea. In *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558903/>
27. Sprong, K. E., Mabenge, M., Wright, C. A., & Govender, S. (2020). Ureaplasma species and preterm birth: current perspectives. *Critical Reviews in Microbiology*, *46*(2), 169–181. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1736986>
28. Tudor, M. E., Al Aboud, A. M., & Gossman, W. (2022, July 23). *Syphilis*. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL); StatPearls Publishing. <https://doi.org/10.1016/j.med.2022.04.001>
29. Unemo, M., Seifert, H. S., Hook, E. W., Hawkes, S., Ndowa, F., & Dillon, J. A. R. (2019). Gonorrhoea. *Nature Reviews Disease Primers*, *5*(79). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0128-6>
30. Van Gerwen, O. T., & Muzny, C. A. (2019). Recent advances in the epidemiology, diagnosis, and management of trichomonas vaginalis infection [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research*, *8*, 1–9. <https://doi.org/10.12688/f1000research.19972.1>

31. WHO. (2023). *Herpes Simplex Virus*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>
32. Willems, H. M. E., Ahmed, S. S., Liu, J., Xu, Z., & Peters, B. M. (2020). Vulvovaginal candidiasis: A current understanding and burning questions. *Journal of Fungi*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/jof6010027>
33. World Health Organization. (2016). *WHO GUIDELINES FOR THE Treatment of Chlamydia trachomatis*.
34. World Health Organization. (2022). *Sexually transmitted infections (STIs)*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis))
35. Yu, J., Zhou, Y., Luo, H., Su, X., Gan, T., Wang, J., Ye, Z., Deng, Z., & He, J. (2023). Mycoplasma genitalium infection in the female reproductive system: Diseases and treatment. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1098276. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1098276>
36. Zhu, S., & Viejo-Borbolla, A. (2021). Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence*, 12(1), 2670–2702. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1982373>

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

| | | | | | |
|--|--|---|---|---|---|
|  IVD | <i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> |  Keep dry Almacenar en lugar seco |  Use by Fecha de caducidad |  Manufacturer Fabricante |  LOT Batch code Número de lote |
|  i | Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso |  Temperature limitation Limitación de temperatura |  Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test |  UDI Unique Device Identification Identificación única de dispositivo |  REF 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* Changes made to the previous instructions for use: All instructions applicable to this product have been unified in one document and the configuration of the master mix has been updated. Sections 3,4,5 and 6 are modified to improve: The explanation of the principle of the procedure (3. Principle of the procedure). Include reagents provided and their concentrations in the product in Annexes. (4. Reagents provided). Better explanation of the list of reagents and equipment to be supplied by the user and the conditions of transport and storage. (5. Reagents and equipment to be supplied by the user and 6. Transport and storage conditions). Section 7 "Precautions for Users" has been updated to better explain some precautions. Section 8.2 "DNA extraction" has been updated. More validated extraction systems have been included | 22/05/2023 |

| | | |
|--|---|--|
| | <p>during new follow-up clinical evaluations. In addition, the extraction procedure has been better explained. Updated Section 9 "Interpretation of Results" to better explain how to interpret controls and patient samples. Section 10 "Limitations" has been updated to better explain some limitations. Section 12. Analytical performance characteristics and 13. Clinical performance characteristics has been updated following the data obtained during the PMPF evaluations. The test procedure (Included in the Annexes) for positive control lyophilization has been updated./</p> <p>Cambios realizados en las instrucciones de uso anteriores:</p> <p>Se han unificado todas las instrucciones aplicables a este producto en un solo documento y se ha actualizado las configuraciones de las master mixes en la tira. Se modifican los Apartados 3,4,5 y 6 para mejorar: La explicación del principio del procedimiento (3. Principio del procedimiento). Incluido los reactivos proporcionados y sus concentraciones en Anexos. (4. Reactivos proporcionados). Mejor explicación de la lista de reactivos y equipos a suministrar por el usuario y las condiciones de transporte y almacenamiento. (5. Reactivos y equipos a suministrar por el usuario y 6. Condiciones de transporte y almacenamiento). Se actualizó la Sección 7 "Precauciones para los usuarios" para explicar mejor algunas precauciones. Se ha actualizado la Sección 8.2 "Extracción de ADN". Se han incluido más sistemas de extracción validados durante las nuevas evaluaciones clínicas de seguimiento. Además, se ha explicado mejor el procedimiento de extracción. Se actualizó la Sección 9 "Interpretación de los resultados" para explicar mejor cómo interpretar los controles y las muestras de pacientes. La Sección 10 "Limitaciones" se ha actualizado para explicar mejor algunas limitaciones. Las Secciones 12. Características del rendimiento analítico y la 13. Características del rendimiento clínico se han actualizado en función de los datos obtenidos en el PMPF. El procedimiento (incluido en los Anexos) para la rehidratación del control positivo se ha actualizado.</p> | |
|--|---|--|

Table A 3. Tabla de Control de Cambios / Control change table.

* Internal traceability info: This document is based on version 00 of the previous Instructions for use (IUo-SP01enes0321 rev.00 and IUo-SP01Eenes0321 rev.00). However, due to this update the content and configuration have changed completely and this version has been established to be the original version.

Revision: 22nd May 2023.

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 rev02