

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

H. ducreyi + C. trachomatis (LGV)

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE <i>H. ducreyi + C. trachomatis (LGV)</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-HCT106L
VIASURE <i>H. ducreyi + C. trachomatis (LGV)</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-HCT106H
VIASURE <i>H. ducreyi + C. trachomatis (LGV)</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-HCT112L
VIASURE <i>H. ducreyi + C. trachomatis (LGV)</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-HCT112H
VIASURE <i>H. ducreyi + C. trachomatis (LGV)</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-HCT113L
VIASURE <i>H. ducreyi + C. trachomatis (LGV)</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-HCT113H

For Research Use Only (RUO)

This product has no declared clinical intended purpose and is not for clinical diagnostic use. No claim or representation is intended to provide information for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific identification and differentiation of *Haemophilus ducreyi* and/or LGV-associated strains of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens, urine samples and rectal samples from patients with signs and symptoms of *Haemophilus ducreyi* infection and/or lymphogranuloma venereum (LGV). This test is intended to be used for research purposes, without any medical objective is not regarded as devices for performance evaluation. DNA is extracted from specimens, multiplied using Real Time amplification and detected using fluorescent reporter dye probes specific for *Haemophilus ducreyi* and *Chlamydia trachomatis* (LGV strains).

2. Summary and Explanation

Haemophilus ducreyi, a gram-negative bacterium, is the causative agent of chancroid, a genital ulcer disease (GUD). The organism is usually spread during sexual intercourse through microabrasions, and the disease usually manifests as multiple painful superficial ulcers associated with inguinal lymphadenitis. As a result of the painful nature of the lesions, patients usually seek immediate treatment, and asymptomatic carriage is therefore uncommon. In addition to causing GUD, *H. ducreyi* has been found in several recent studies to be a major cause of chronic skin ulceration in children from developing countries.

Chancroid or soft chancre is a sexually transmitted disease (STD) of humans, characterized by painful genital ulcers. The primary ulcer is often followed by multiple lesions, which can extend the duration of the illness to 1-3 months if appropriate treatment is not given. Traditionally, chancroid has been difficult to diagnose clinically, because similar symptoms can occur in infections with *Treponema pallidum* (syphilis) and Herpes simplex virus. Laboratory diagnoses can be equally frustrating, as *Haemophilus ducreyi*, the causative agent of chancroid, does not survive well in most transport media, has complex nutritional requirements for growth, and once isolated is poorly reactive biochemically.

Chlamydia trachomatis (Ct) is a gram-negative obligate intracellular pathogen responsible for over 110 million global sexually transmitted disease (STD) cases annually, with sequelae including pelvic inflammatory disease (PID), ectopic pregnancy, and infertility. Ct is also responsible for outbreaks of lymphogranuloma venereum (LGV) and trachoma, a chronic ocular disease that can lead to blindness.

LGV is caused by specific serovars of *Chlamydia trachomatis* (L1, L2 and L3) and these strains are associated with a more chronic and invasive infection than other serovars. Although LGV symptoms can vary according to site of entry and stage of infection, genital ulceration and inguinal lymphadenopathy are the classical presentations of this disease. The laboratory identification of LGV can be problematic, as routine culture of *C. trachomatis* for diagnostic purposes has largely been replaced with nucleic acid amplification techniques.

The detection method applied at the beginning was based on the culture, which takes a long time to complete and many difficulties. To shorten detection time and improve sensitivity, real-time PCR assays have proven to be a tool for the detection of *Haemophilus ducreyi* and *Chlamydia trachomatis* (LGV).



3. Principle of the procedure

VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific identification and differentiation of *Haemophilus ducreyi* and/or LGV-associated strains of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens, urine samples and rectal samples from patients with signs and symptoms of *Haemophilus ducreyi* infection and/or lymphogranuloma venereum (LGV). After DNA isolation, the identification of *Haemophilus ducreyi* and LGV-associated strains of *Chlamydia trachomatis* is performed by the amplification of a conserved region of the 16S rRNA gene for *Haemophilus ducreyi* and *pmpH* gene for LGV-associated *C. trachomatis* serovars, using specific primers and a fluorescent-labelled probe.

VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit is based on the 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bounded to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of target template. This fluorescence can be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase) in an stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. *Chlamydia trachomatis* (LGV strains) DNA targets are amplified and detected in the FAM channel, *Haemophilus ducreyi* DNA targets are amplified and detected in the ROX channel and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

4. Reagents provided

VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1 and Table 2:

Reference	Reagent/Material	Description	Colour	Amount
VS-HCT1SL/ VS-HCT1SH	<i>H. ducreyi</i> + <i>C. trachomatis</i> (LGV) 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	6/12 x 8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-HCT1C	<i>H. ducreyi</i> + <i>C. trachomatis</i> (LGV) Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 X 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-HCT106L, VS-HCT106H, VS-HCT112L and VS-HCT112H.



Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-HCT1PL/ VS-HCT1PH	<i>H. ducreyi</i> + <i>C. trachomatis</i> (LGV) 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-HCT1C	<i>H. ducreyi</i> + <i>C. trachomatis</i> (LGV) Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	RNAse/DNAse free water	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-HCT113L and VS-HCT113H.

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 *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- DNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortexer.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.

VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DPrime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System and VIASURE 96 Real Time PCR System. When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506).

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

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.



- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

- This VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection kit is for Research Use Only.
- The product is intended for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- Do not use past expiration date.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (if available, Ref. VS-HCT113L and VS-HCT113H). Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different envelopes and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Consult safety data sheets, upon request.

8. Test procedure

8.1. DNA extraction

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

For DNA extraction from urogenital specimens, urine samples and rectal samples you can use your manual or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available DNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions. We have validated the following extraction kits:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.



- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- ZP02006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit, using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).
- US121 NX-48 Urine/Swab DNA Kit using the Nexttractor® NX-48 (Genolution Inc.).
- MagDEA® Dx SV, using magLEAD® 6gC (Precision System Science)).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).

8.2. Lyophilized positive control

H. ducreyi + *C. trachomatis* (LGV) 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 *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Positive Control (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

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

8.3. PCR protocol

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

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

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

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps. It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

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

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

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

Table 3. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*C. trachomatis* (LGV)), ROX (*H. ducreyi*) and HEX, JOE or VIC channels (CI). Depending on the equipment used select the proper detection



channel (see Annex 2). In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, StepOne Plus™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that the passive reference option for ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Result interpretation

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) in the positive control well. Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.

Using the following table read and analyze the results:

<i>C. trachomatis</i> (LGV) (FAM)	<i>H. ducreyi</i> (ROX)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	<i>C. trachomatis</i> (LGV) and <i>H. ducreyi</i> Positives
-	-	+	-	+	<i>C. trachomatis</i> (LGV) and <i>H. ducreyi</i> Negative
+	-	+/-	-	+	<i>C. trachomatis</i> (LGV) Positive and <i>H. ducreyi</i> Negative
-	+	+/-	-	+	<i>H. ducreyi</i> Positive and <i>C. trachomatis</i> (LGV) Negative
-	-	-	-	+	Experiment fail
+	+	+	+	-	Experiment fail

Table 4. Sample interpretation

+: Amplification curve

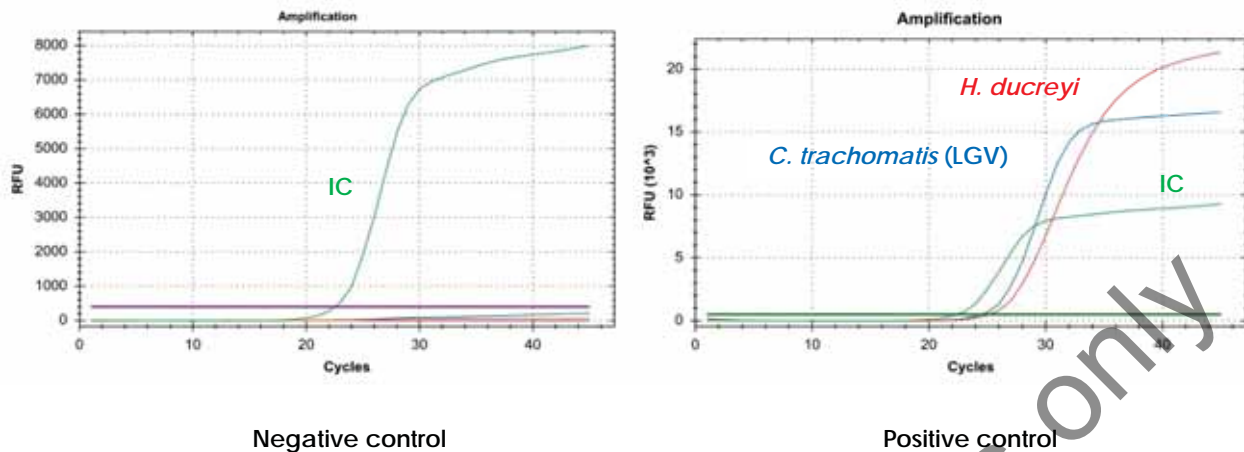
-: No amplification curve

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids

A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.



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



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

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

10. Limitations of the test

- The test must be used for RUO purposes (Exclusive Use in Research), without any medical objective.
- Although this assay can be used with other types of samples, it has been validated only with DNA extracted from urogenital specimens (included endocervical specimens and urethral samples), urine and rectal samples.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from clinical samples must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *H. ducreyi* and *C. trachomatis* (LGV) either by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

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



12. Preliminary results of the test characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit was evaluated using 4 different QCMD panels (2 from the QCMD 2017 *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* DNA EQA Programme and 2 other from the QCMD 2017 *Chlamydia trachomatis* DNA EQA Programme). These panels consist of 19 clinical specimens dissolved in transport medium. VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit assay found 10/19 positive samples for *C. trachomatis* (LGV) (6 Simulated Swabs and 4 urines). The results were compared with the QCMD 2017 *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* DNA EQA Programme and the QCMD 2017 *Chlamydia trachomatis* DNA EQA Programme final report. All *Chlamydia trachomatis* (LGV strains) samples could be detected. Non-LGV *Chlamydia trachomatis* were not detected.

VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit was evaluated in a Multicenter Evaluation conducted through collaboration with the National Microbiology Departments from different entities. VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit was evaluated using in total 115 clinical specimens (69 endocervical specimens, 4 urethral samples, 21 urogenital specimens, 9 rectal sample, 11 urine samples and 1 serum sample). VIASURE assay found 16/115 positive samples for *C. trachomatis* (LGV) infection (7 endocervical biological matrix, 4 urogenital specimens, 4 rectal samples, and 1 urine sample). These samples were analysed for *H. ducreyi* as well, proving to all be negative.

Besides, the clinical performance of VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit for *H. ducreyi* was testing using urine samples from symptomatic patients. Positive results were obtained for 10 samples which were spiked with synthetic *H. ducreyi* DNA a prior to nucleic acid extraction.

In conclusion, the results show a high sensitivity and specificity to detect LGV-associated strains of *Chlamydia trachomatis* and *H. ducreyi* using VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction for *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) (Figure 2 and 3).



Figure 2. Dilution series of *C. trachomatis* (LGV) (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel FAM).

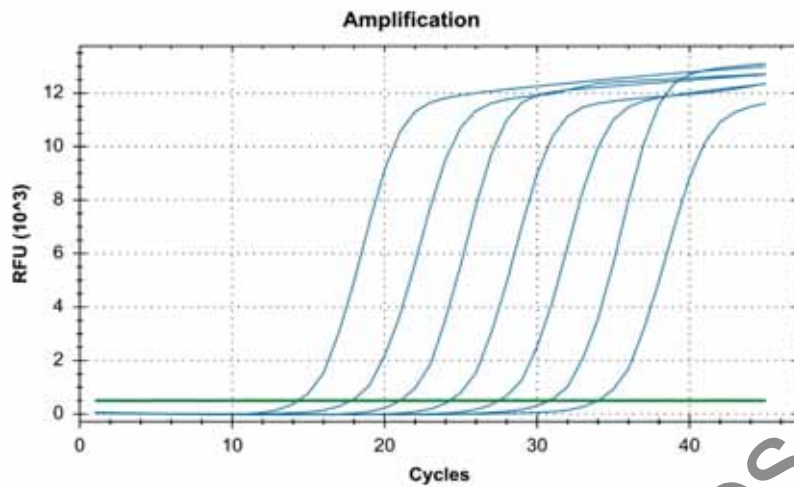
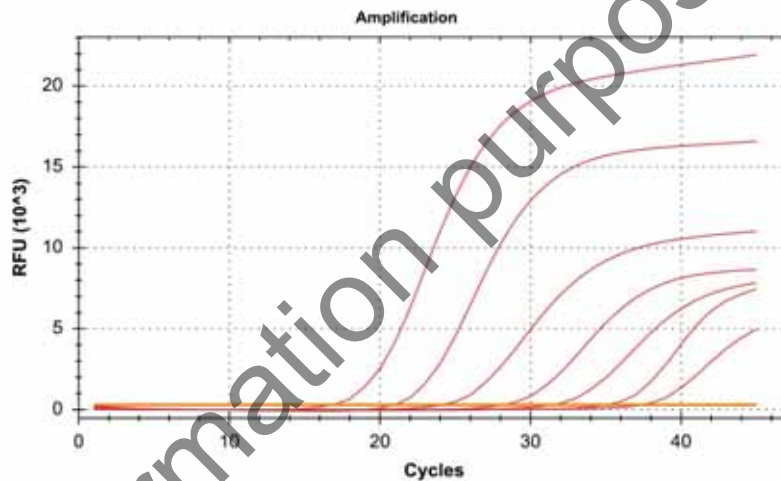


Figure 3. Dilution series of *H. ducreyi* (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel ROX).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common sexually transmitted diseases pathogens. No cross-reactivity was detected between almost any of the following microorganisms tested, except the targeted pathogens of each assay.



Cross-reactivity testing					
<i>Candida parapsilosis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	<i>Escherichia coli</i> O.1285; O18:H7:K1	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Candida krusei</i>	-	<i>Haemophilus influenza</i> MinnA	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
<i>Candida dubliniensis</i>	-	<i>Haemophilus ducreyi</i> class 1	-/+	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Listeria ivanovii</i>	-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Ureaplasma parvum</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> (Genovar F)	-	<i>Listeria innocua</i>	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV)	-/+	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	Cytomegalovirus	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> (SW)	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-	Herpes simplex virus 1	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	Herpes simplex virus 2	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	Human papillomavirus 16	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-	Human papillomavirus 18	-

Table 5. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit for *C. trachomatis* (LGV strains) was evaluated against *C. trachomatis* (LGV) showing positive result.

The reactivity of VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit for *H. ducreyi* was evaluated against *Haemophilus ducreyi* class 1 showing positive result.



ANNEX 1

COMPATIBILITY WITH THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

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

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

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	Optical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well / CFX96™ Deep Well IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Select Ramp Speed "Standard".
 (2) See Annex 3 to check optical measurement exposure setting.
 (3) The product should be reconstituted following the appropriate procedure (see Test Procedure, section 8.3) and transferred into the specific tubes designed to perform on Rotor-Gene® Q or SmartCycler® instruments.
 (4) Shell Frame grid plate which fits in these Roche qPCR System is necessary.
 (5) No detection in Cy5 channel.
 (6) Detection in FAM and HEX channels only.

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



ANNEX 2

DETECTION CHANNELS FOR THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

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

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	VIASURE CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation is required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

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



ANNEX 3

OPTICAL MEASUREMENT EXPOSURE SETTING

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Set exposition values as follow:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) and VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel -150, HEX channel – 3000, ROX channel – 2000 and Cy5 channel - 1500.
- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology) and VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel - 150, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel – 100.

For information purposes only



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica del *Haemophilus ducreyi* y/o cepas de *Chlamydia trachomatis* asociadas a LGV en muestras urogenitales, muestras de orina y muestras rectales procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección por *Haemophilus ducreyi* y/o linfogranuloma venéreo (LGV). El uso previsto del test es con fines de investigación, sin ningún objetivo médico, no se consideran dispositivos para la evaluación del rendimiento. El DNA es extraído a partir de las muestras, 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 *H. ducreyi* y *C. trachomatis* (cepas LGV).

2. Introducción y explicación

Haemophilus ducreyi, una bacteria gramnegativa, es el agente causante del chancroide, una enfermedad ulcerosa genital (GUD, por sus siglas en inglés). Este microorganismo generalmente se disemina durante las relaciones sexuales a través de microabrasiones, y la enfermedad generalmente se manifiesta como múltiples úlceras superficiales dolorosas asociadas con linfadenitis inguinal. Como resultado de la naturaleza dolorosa de las lesiones, los pacientes generalmente buscan tratamiento inmediato, y el transporte asintomático es por lo tanto poco común. Además de causar GUD, *H. ducreyi* se ha encontrado en varios estudios recientes como una causa importante de ulceración crónica en la piel en niños de países en desarrollo.

Chancroide o chancro suave es una enfermedad de transmisión sexual (ETS) de los seres humanos, que se caracteriza por úlceras genitales dolorosas. La úlcera primaria suele ir seguida de múltiples lesiones, que pueden extender la duración de la enfermedad a 1-3 meses si no se administra el tratamiento adecuado. Tradicionalmente, el chancro blando ha sido difícil de diagnosticar clínicamente, porque síntomas similares pueden ocurrir en infecciones con *Treponema pallidum* (sífilis) y el virus Herpes simplex. El diagnóstico de laboratorio pueden ser igualmente frustrante, ya que *Haemophilus ducreyi*, el agente causante del chancroide, no sobrevive bien en la mayoría de los medios de transporte, tiene requisitos nutricionales complejos para el crecimiento y, una vez aislado, es poco reactivo bioquímicamente.

Chlamydia trachomatis (Ct) es un patógeno intracelular obligatorio gramnegativo responsable de más de 110 millones de casos de enfermedades de transmisión sexual (ETS) anuales, con secuelas que incluyen enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), embarazo ectópico e infertilidad. Ct también es responsable de los brotes de linfogranuloma venéreo (LGV) y tracoma, una enfermedad ocular crónica que puede conducir a la ceguera.

El LGV es causado por serotipos específicos de *Chlamydia trachomatis* (L1, L2 y L3) y estas cepas se asocian con una infección más crónica e invasiva que otros serovares. Aunque los síntomas de LGV pueden variar de acuerdo con el sitio de entrada y el estadio de la infección, la ulceración genital y la linfadenopatía inguinal son las presentaciones clásicas de esta enfermedad. La identificación de laboratorio de LGV puede ser problemática, ya que el cultivo rutinario de *C. trachomatis* para fines de diagnóstico ha sido reemplazado en gran medida por técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.



El método de detección aplicado al principio se basó en el cultivo, pero el tiempo de incubación es largo y, a veces, presenta muchas dificultades. Para acortar el tiempo de detección y mejorar la sensibilidad, los ensayos de PCR en tiempo real han demostrado ser una buena herramienta para la detección de *Haemophilus ducreyi* y *Chlamydia trachomatis* (LGV).

3. Procedimiento

VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica del *Haemophilus ducreyi* y/o cepas de *Chlamydia trachomatis* asociadas a LGV en muestras urogenitales, muestras de orina y muestras rectales procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección por *Haemophilus ducreyi* y/o linfogranuloma venéreo (LGV). Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *Haemophilus ducreyi* y cepas de *Chlamydia trachomatis* asociadas a LGV se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan en una región conservada del gen 16S rRNA para *H. ducreyi* y *pmpH* para serovares de *Chlamydia trachomatis* asociadas a LGV.

VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) 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 *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la reacción de amplificación *C. trachomatis* (cepas LGV) se detecta en el canal FAM, *H. ducreyi* se detecta en el canal ROX y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1 y 2:



Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-HCT1SL/ VS-HCT1SH	<i>H. ducreyi</i> + <i>C. trachomatis</i> (LGV) 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-HCT1C	<i>H. ducreyi</i> + <i>C. trachomatis</i> (LGV) Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HCT106L, VS-HCT106H, VS-HCT112L y VS-HCT112H.

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-HCT1PL/ VS-HCT1PH	<i>H. ducreyi</i> + <i>C. trachomatis</i> (LGV) 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-HCT1C	<i>H. ducreyi</i> + <i>C. trachomatis</i> (LGV) Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HCT113L y VS-HCT113H.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit.

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



VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

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

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

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

7. Precauciones para el usuario

- El kit VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit es solo para uso en investigación.
- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible, Ref. VS-HCT113L y VS-HCT113H). 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.



- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.

8. Procedimiento del test

8.1. Extracción de DNA

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

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

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado 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.).
- MagDEA® Dx SV, utilizando magLEAD® 6gC (Precision System Science)).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) 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 *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.



8.3. Protocolo PCR

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

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

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

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

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

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

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

Tabla 3. Protocolo PCR

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

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV). Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:



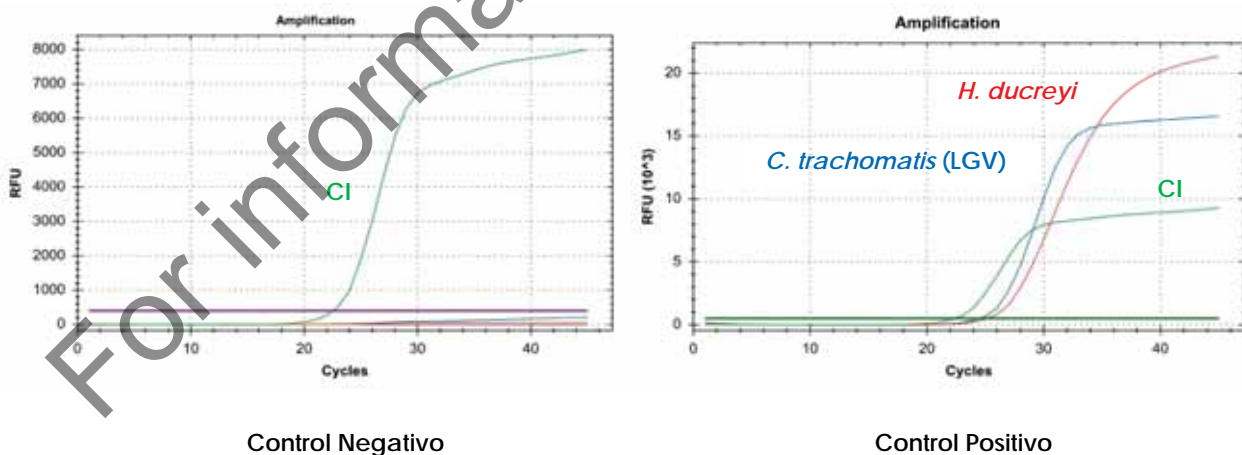
<i>C. trachomatis</i> (LGV)(FAM)	<i>H. ducreyi</i> (ROX)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	<i>C. trachomatis</i> (LGV) y <i>H. ducreyi</i> Positivos
-	-	+	-	+	<i>C. trachomatis</i> (LGV) y <i>H. ducreyi</i> Negativos
+	-	+/-	-	+	<i>C. trachomatis</i> (LGV) Positivo y <i>H. ducreyi</i> Negativo
-	+	+/-	-	+	<i>H. ducreyi</i> Positivo y <i>C. trachomatis</i> (LGV) Negativo
-	-	-	-	+	Inválido
+	+	+	+	-	Inválido

Tabla 4. Interpretación
 +: curva de amplificación
 -: sin curva de amplificación

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

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.

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



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

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



10. Limitaciones del test

- La prueba debe usarse con fines RUO (uso exclusivo en investigación), sin ningún objetivo médico.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de muestras urogenitales (incluyendo endocervicales y uretrales), muestras de orina y rectales.
- 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. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *H. ducreyi* y *C. trachomatis* (LGV) ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

11. Control de calidad

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

12. Resultados preliminares de las características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit se evaluó mediante 4 paneles de QCMD diferentes (2 paneles del programa de QCMD 2017 *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* DNA EQA Programme y 2 paneles de QCMD 2017 *Chlamydia trachomatis* DNA EQA Programme). Estos paneles constan de 19 muestras clínicas disueltas en un medio de transporte. VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit encontró 10/19 muestras positivas para *C. trachomatis* (LGV) (6 hisopos simulados y 4 muestras de orina) Los resultados se compararon con el informe final de los programas EEC QCMD 2017 *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* DNA EQA Programme y QCMD 2017 *Chlamydia trachomatis* DNA EQA Programme. Todas las muestras de *C. trachomatis* (LGV) pudieron ser detectadas. Las muestras de *C. trachomatis* no LGV no fueron detectadas.

VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit se evaluó en una Evaluación Multicentros realizada a través de la colaboración con los Departamentos Nacionales de Microbiología de diferentes entidades. VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit se evaluó con 115 muestras clínicas (69 muestras endocervicales, 4 muestras uretrales, 21 muestras urogenitales, 9 muestras rectales, 11 muestras de orina y 1 muestra de suero). El ensayo de VIASURE encontró 16/115 muestras positivas para la infección por *C. trachomatis* (LGV) (7 matriz biológica endocervical, 4 muestras urogenitales, 4 muestras rectales, y 1 muestra de orina). Estas muestras también fueron analizadas para *H. ducreyi*, resultando todas negativas.



Además, el rendimiento clínico del test VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit para *H. ducreyi* se analizó utilizando muestras de orinas de pacientes sintomáticos. Se obtuvieron resultados positivos para las 10 muestras que fueron contaminadas con DNA sintético de *H. ducreyi* antes de la extracción de ácidos nucleicos.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar cepas de *Chlamydia trachomatis* asociadas a LGV y *H. ducreyi*; utilizando VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción para Virus BK y Virus JC. (Figura 2 y 3).

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar *C. trachomatis* (LGV) (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).

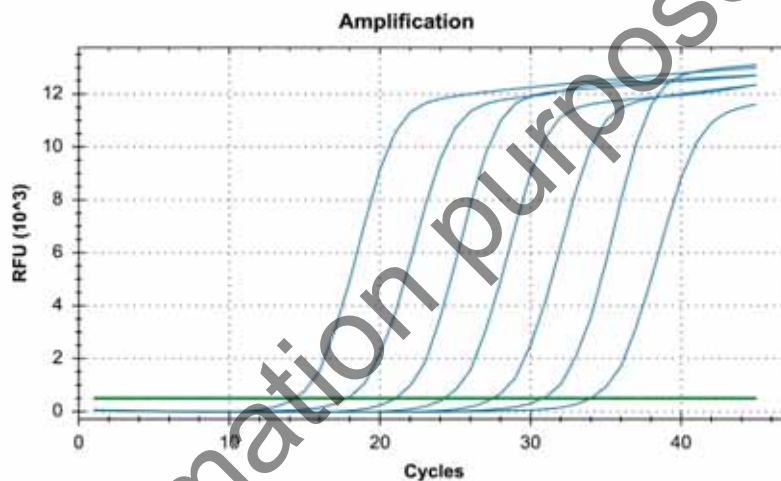
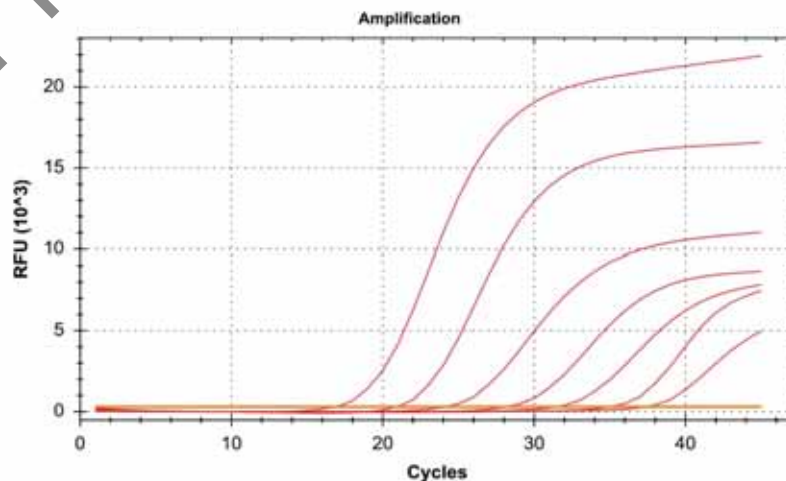


Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar *H. ducreyi* (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal ROX).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos transmitidos por enfermedades de transmisión sexual más comunes. No se detectaron reacciones cruzadas con casi ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los patógenos diana que detecta cada ensayo.

Cross-reactivity testing					
<i>Candida parapsilosis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	<i>Escherichia coli</i> O1285; O18:H7:K1	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Candida krusei</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
<i>Candida dubliniensis</i>	-	<i>Haemophilus ducreyi</i> class 1	-/+	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Listeria ivanovii</i>	-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Ureaplasma parvum</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> (Genovar F)	-	<i>Listeria innocua</i>	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV)	-/+	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	Cytomegalovirus	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> (SW)	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-	Virus del Herpes simple 1	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	Virus del Herpes simple 2	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	Papillomavirus humano 16	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-	Papillomavirus humano 18	-

Tabla 5. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit para *C. trachomatis* (cepas LGV) se evaluó frente a *C. trachomatis* (LGV), mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *H. ducreyi* + *C. trachomatis* (LGV) Real Time PCR Detection Kit para *H. ducreyi* se evaluó frente a *Haemophilus ducreyi* clase 1, mostrando un resultado positivo.











13. Bibliography/Bibliografía

1. L. M. Parsons *et al.* Laboratory Diagnosis of Chancroid Using Species-Specific Primers from *Haemophilus ducreyi* groEL and the Polymerase Chain Reaction. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease* 1995; 23:89-98.
2. C. González-Beiras *et al.* Epidemiology of *Haemophilus ducreyi* Infections. *Emerging Infectious Diseases journal* 2016; 22(1): 1-8.



3. R.S Turingan *et al.* Rapid detection and strain typing of *Chlamydia trachomatis* using a highly multiplexed microfluidic PCR assay. *PLoS ONE* 2017; 12(5): e0178653.
4. S. Alexander *et al.* A comparison of two methods for the diagnosis of lymphogranuloma venereum. *Journal of Medical Microbiology* 2008; 57, 962–965.
5. M. Rodríguez-Domínguez *et al.* Clinical and epidemiological characterization of a lymphogranuloma venereum outbreak in Madrid, Spain: co-circulation of two variants. *Clinical Microbiology and Infection* 2014; 20(3): 219-225.
6. M. Glatz *et al.* A multicenter prospective trial to asses a new real-time polymerase chain reaction for detection of *Treponema pallidum*, herpes simplex-1/2 and *Haemophilus ducreyi* in genital, anal and oropharyngeal ulcers. *Clinical Microbiology and Infection* 2014; 20(12): O1020-7.

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

 <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	 Batch code Número de lote
 Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso	 Temperature limitation Limitación de temperatura	 Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	 Sample diluent Diluyente de muestra	 Catalogue number Número de referencia



ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

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

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

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	Optical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well / CFX96™ Deep Well IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".

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

(3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test, sección 8.3) y transvasar a los tubos específicos diseñados para emplearse con los instrumentos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.

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

(5) No lectura en canal Cy5.

(6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

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



ANEXO 2

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

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

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

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



ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -150, canal HEX - 3000, canal ROX - 2000 y canal Cy5 -1500.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -150, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 – 100.

For information purposes only



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

Revision: October 2018

For information purposes only



For information purposes only



For information purposes only



For information purposes only



CerTest Biotec, S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II - Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es



VIASURE online

F-349 rev00

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC