

# VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest  
BIOTEC

## Sexual Health Panel I

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

VIASURE <i>Sexual Health Panel I</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-SP0112L
VIASURE <i>Sexual Health Panel I</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-SP0112H
VIASURE <i>Sexual Health Panel I</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-SP0113L
VIASURE <i>Sexual Health Panel I</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-SP0113H

### 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 *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific identification and differentiation of *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and/or *Mycoplasma hominis*; Herpes virus 1, Herpes virus 2 and/or *Treponema pallidum*; *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* and/or *Trichomonas vaginalis* in urogenital specimens, urine samples and rectal samples from patients with signs and symptoms of sexually transmitted diseases (STDs). 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 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*, *G. vaginalis* and *T. 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. Etiological agents responsible for STIs include fungi, bacteria, parasites and viruses. Some of these microorganisms are eliminated after a period of time, while others are recurrent and some remain in the body asymptotically, allowing the progress of the disease and generating consequences such as inflammations of the genito-urinary tract, infertility and even the development of cancer.

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

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

*Mycoplasma genitalium* is a facultative anaerobic organism and a recognized cause of nongonococcal urethritis in men. In women, *M. genitalium* has been associated with cervicitis, endometritis, pelvic inflammatory disease



(PID), infertility, susceptibility to human immunodeficiency virus (HIV), and adverse birth outcomes, indicating a consistent relationship with female genital tract pathology. The long-term reproductive consequences of *M. genitalium* infection in asymptomatic individuals need to be investigated further.

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

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

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

Genital herpes can be caused by two very similar viruses, herpes simplex virus HSV-1 or HSV-2, being the infections caused by first one more often. Herpes simplex virus (HSV)-1 and -2 are large, double-stranded DNA viruses that cause lifelong persistent infections characterized by periods of quiescence and recurrent disease. These two HSV types cannot be distinguished clinically. In fact, they share a high degree of genetic homology, but they also have specific regions with small nucleotide variations which may allow discrimination. HSV-1 and HSV-2 infection occurs via inoculation of virus particles into susceptible mucosal surfaces. Afterwards, these neurotropic viruses can become latent in the local sensory ganglion, periodically reactivating to cause symptomatic lesions, or undergo asymptomatic viral release, with the potential for disease transmission and infection. The same treatment is used for both HSV-1 and HSV-2 infections, the location of the lesions and the chronicity of the infection (primary or recurrent) determine dosage and frequency.

The spirochete *Treponema pallidum*, the etiologic agent of syphilis, causes a multistage sexually transmitted infection (STI). Pathogenic treponemes cause venereal syphilis, yaws, endemic syphilis, and pinta—multistage, infections that, although similar, can be differentiated based on clinical, epidemiologic, and geographic criteria. Only venereal syphilis is transmitted by sexual activity. The pathogenic treponemes are uncultivable, slow-growing microorganisms with identical flat-wave morphologies. They poorly tolerate desiccation, elevated



temperature, and ambient oxygen tension, traits that explain why efficient transmission requires close personal contact.

*Candida albicans*, is a common opportunistic fungal pathogen that dwells on human mucosal surfaces, can cause fungal infections, especially in immunocompromised and high-risk surgical patients. Although *Candida albicans* is still the major species isolated from clinical samples in the majority of individuals, it is well known that some other non-*albicans Candida* spp. such as *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, and *Candida tropicalis* infections are significantly widespread.

*Gardnerella vaginalis* is a facultative Gram-variable anaerobic bacterium belonging to the family *Bifidobacteriaceae* and is the dominant species involved in bacterial vaginosis (BV). Although BV is a polymicrobial condition with no single causative agent, 100 % of women with BV are colonized with *G. vaginalis*. *G. vaginalis* is also a normal commensal of the vaginal micro flora in healthy women.

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

### 3. Principle of the procedure

VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit is designed for the identification and differentiation of *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum* and/or *M. hominis*; HSV 1, HSV 2 and/or *T. pallidum*; *C. albicans*, *G. vaginalis* and/or *T. vaginalis* in urogenital specimens, urine samples and rectal samples. After DNA isolation, the identification of *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum* and/or *M. hominis*; HSV 1, HSV 2 and/or *T. pallidum*; *C. albicans*, *G. vaginalis* and/or *T. vaginalis* is performed by the amplification of a conserved region of the specific genes (Table 3, Pathogens detected in each reaction tube and target genes) using specific primers and fluorescent-labelled probes.

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, polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition (if present). Each DNA targets are amplified and detected in specific channels (FAM, HEX, ROX, and/or Cy5) and the internal control (IC) in HEX and/or Cy5 channels (if present) (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2) (Table 5).



#### 4. Reagents provided

VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables 1 and 2:

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Sexual Health Panel I</i> 8-well strips (2 Hyperplex reaction)	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control (if present) in stabilized format	White	6/12 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Sexual Health Panel I</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 X 8-cap strip


Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-SP0112L and VS-SP0112H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Sexual Health Panel I</i> 96-well plate (2 Hyperplex reaction)	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control (if present) in stabilized format	White	1 plate
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Sexual Health Panel I</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-SP0113L and VS-SP0113H.



Sexual Health Panel I 8-well strip (2 Hyperplex) contains in each reaction well the following reaction mixes for the detection of the specific targets (Table 3):



	Code	Controls	Reaction mix placed into each well Pathogens and target genes
1	NMT	IC	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> & <i>Mycoplasma genitalium</i>
			<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ( <i>porA</i> and <i>Opa</i> genes), <i>Chlamydia trachomatis</i> (a region within ORF2 of the chlamydial plasmid) and <i>Mycoplasma genitalium</i> ( <i>MgPa adhesin</i> gene)
2	URE	-	<i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Ureaplasma parvum</i> & <i>Mycoplasma hominis</i>
			<i>Trichomonas vaginalis</i> ( <i>T. vaginalis</i> -specific 2-kb repeated sequence), <i>Ureaplasma urealyticum</i> and <i>Ureaplasma parvum</i> ( <i>ureasa</i> gene), <i>Mycoplasma hominis</i> ( <i>yidC</i> gene)
3	HHT	IC	<i>Herpes virus 1</i> , <i>Herpes virus 2</i> & <i>Treponema pallidum</i>
			Herpes virus 1 ( <i>US4</i> gene), Herpes virus 2 ( <i>US6</i> gene) and <i>Treponema pallidum</i> (16S rRNA gene)
4	CGT	IC	<i>C. albicans</i> , <i>G. vaginalis</i> & <i>T. vaginalis</i>
			<i>Trichomonas vaginalis</i> ( <i>T. vaginalis</i> -specific 2-kb repeated sequence), <i>Candida albicans</i> (5.8S rRNA gene) and <i>Gardnerella vaginalis</i> (16S rRNA gene)

Table 3. Sexual Health Panel I 8-well strips provided in VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit. Reaction mix placed into each well, pathogens detected and target genes. IC: Internal control. Note that the first reaction mix is placed into the ends of the strip.

## 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.
- 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 Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), 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 *Sexual Health Panel I* 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-SP0113L and VS-SP0113H). 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.
- **Note that the first reaction mix is placed into the ends of the strip.**
- 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 clinical samples you can use your manual or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available DNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions. 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).
- ZPO2006 MagPurix Bacterial DNA Extraction Kit, using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).
- US121 NX-48 Urine/Swab DNA Kit using the Nextractor® NX-48 (Genolution Inc.).
- MagDEA® Dx SV, using magLEAD® 6gC (Precision System Science)).
- NucleoSpin® RNA Virus (MACHEREY-NAGEL).
- NucleoMag® Pathogen (MACHEREY-NAGEL).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).

### 8.2. 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 200 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

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

### 8.3. PCR protocol

Determine and separate the number of required strips, including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from plate or strips. **Note that the first reaction mix is placed into the ends of the strip (Table 3) and each strip includes two Hyperplex reactions, wells 1 to 4: NMT, URE, HHT and CGT reaction mixes).**

- 1) Reconstitute the number of strips (Hyperplex reactions) 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) in the 8 wells of each strip 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 the thermocycler (to check compatibility see Annex 1).


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

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

Table 4. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (\*) through the FAM, ROX, Cy5 and/or HEX (JOE or VIC) channels following Table 5. Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2).

The reaction mixes places in each well of Hyperplex strip allow the detection of the specific target pathogens in the following channels (Table 5).



Code	Channels			
	FAM	HEX	ROX	Cy5
1 NMT	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Internal Control
2 URE	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
3 HHT	Herpes virus 1	Internal Control	Herpes virus 2	<i>Treponema pallidum</i>
4 CGT	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Internal Control	<i>Candida albicans</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
4 CGT	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Internal Control	<i>Candida albicans</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
3 HHT	Herpes virus 1	Internal Control	Herpes virus 2	<i>Treponema pallidum</i>
2 URE	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
1 NMT	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Internal Control

Table 5. Pathogens identified in each detection channel.



## 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 of each well from Hyperplex reaction (4 wells) and the presence of signal for *Sexual Health Panel I* positive control of each well from Hyperplex reaction (4 wells). Check Internal Control signal (with the exception of URE reaction mix) 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.

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40 and the internal control (if available) 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 (if available). An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control (if available). Using the following table read and analyze the results:

	Reaction Mix	Pathogens	Channels			
			FAM	HEX	ROX	Cy5
1	NMT	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Positive			
		<i>Mycoplasma genitalium</i>		Positive		
		<i>Neisseria gonorrhoeae</i>			Positive	
		Internal Control				Positive/Negative
2	URE	<i>Trichomonas vaginalis</i> *	Positive			
		<i>Ureaplasma urealyticum</i>		Positive		
		<i>Ureaplasma parvum</i>			Positive	
		<i>Mycoplasma hominis</i>				Positive
3	HHT	Herpes virus 1	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
		Herpes virus 2			Positive	
		<i>Treponema pallidum</i>				Positive
4	CGT	<i>Trichomonas vaginalis</i> *	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
		<i>Candida albicans</i>			Positive	
		<i>Gardnerella vaginalis</i>				Positive

Table 6. Sample interpretation. 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*.



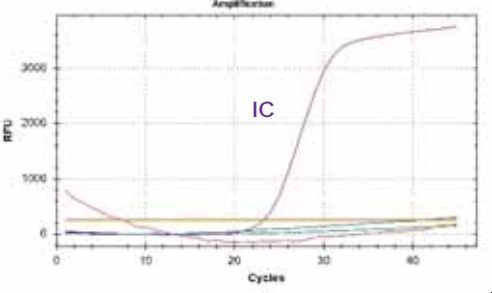
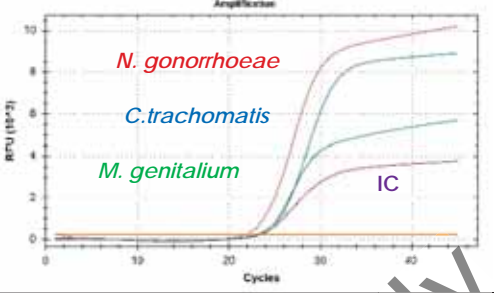
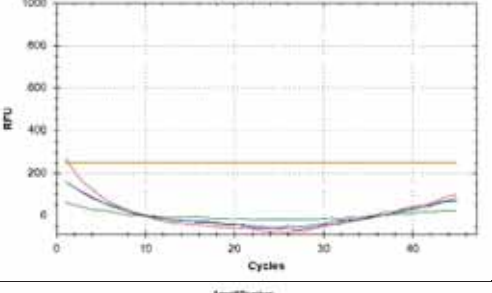
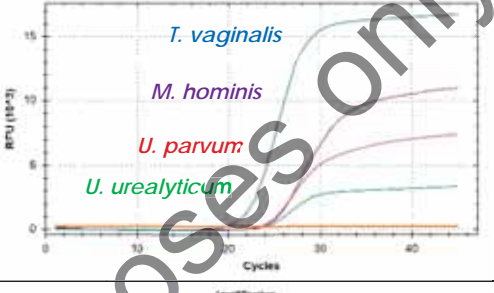
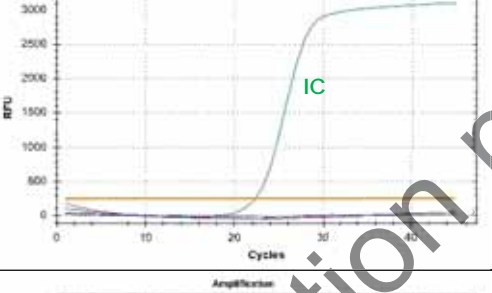
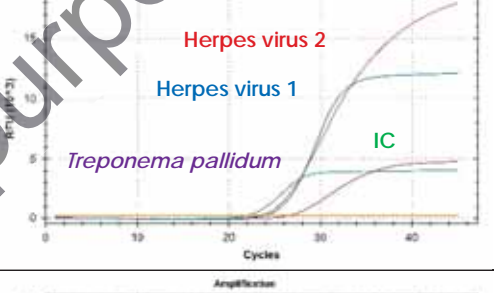
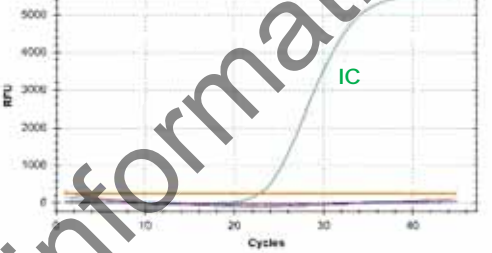
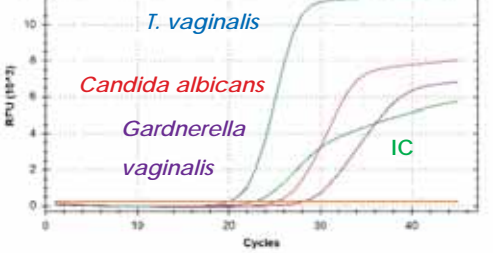
	Reaction Mix	Negative Control	Positive Control
1	NMT		
2	URE		
3	HHT		
4	CGT		

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

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

In case of absence of internal control signal in sample wells (with the exception of URE reaction mix), 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 STD swabs (urogenital male or genital female origin), endocervical specimens, urethral samples, urogenital specimens,



rectal-vaginal specimens, rectal sample, vaginal specimen, urine samples, serum sample, semen and throat samples (for URE and NMT); samples in transport medium, endocervical swabs, urine, plasma, cell lysates and synthetic CSF (for HHT); and endocervical swab, vaginal swab, and vagino-rectal swabs, urine, plasma, bronchoalveolar lavage (BAL) saline, sputum and samples in transport medium (for CGT).

- 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 *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum* and/or *M. hominis*; HSV 1, HSV 2 and/or *T. pallidum*; *C. albicans*, *G. vaginalis* and/or *T. vaginalis*, either samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

## 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) in each well confirms the correct performance of the technique (with the exception of URE reaction mix).

## 12. Preliminary results of the test characteristics

### 12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of **Sexually Transmitted Diseases Reaction mix** (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* & *Mycoplasma genitalium* and *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* & *Mycoplasma hominis*) was tested using 130 different specimens (endocervical specimens, urogenital specimens, urethral samples, vaginal specimens, rectal-vaginal specimens, urine samples, serum samples, semen and throat samples) from symptomatic patients.

These results of both Multiplex reactions were compared with those obtained with a molecular detection method (FTD Urethritis plus (Fast Track Diagnostics)).

The results were as follows:

Sexually Transmitted Diseases Reaction mix	FTD Urethritis plus (Fast Track Diagnostics)			Total
		+	-	
+		12	2*†	14
-		4*#	112	116
Total		16	114	130

Table 8. Comparative results for *Neisseria gonorrhoeae*.

\*The low amount of template DNA in these genitourinary samples is below the detection limit of the method used. †1/2 sample was confirmed by Seegene test as positive. # Neither identified by routine diagnosis.



Sexually Transmitted Diseases Reaction mix	FTD Urethritis plus (Fast Track Diagnostics)			
		+	-	Total
	+	37	4*‡	41
	-	3#	86	89
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>90</b>	<b>130</b>	

Table 9. Comparative results for *Chlamydia trachomatis*.

\*The low amount of template DNA in these genitourinary samples is below the detection limit of the method used. ‡ 4/4 samples were confirmed by routine diagnosis. # 2/3 identified by routine diagnosis.

Sexually Transmitted Diseases Reaction mix	FTD Urethritis plus (Fast Track Diagnostics)			
		+	-	Total
	+	7	0	7
	-	1*	122	123
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>122</b>	<b>130</b>	

Table 10. Comparative results for *Mycoplasma genitalium*.

\*The low amount of template DNA in this genitourinary sample is below the detection limit of the method used.

Sexually Transmitted Diseases Reaction mix	FTD Urethritis plus (Fast Track Diagnostics)			
		+	-	Total
	+	39	0	39
	-	3*#	88	91
<b>Total</b>	<b>42</b>	<b>88</b>	<b>130</b>	

Table 11. Comparative results for *Trichomonas vaginalis*.

\*The low amount of template DNA in these genitourinary samples is below the detection limit of the method used. # 2/3 identified by routine diagnosis.

Sexually Transmitted Diseases Reaction mix	FTD Urethritis plus (Fast Track Diagnostics)			
		+	-	Total
	+	26	4*‡	30
	-	3*#	97	100
<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>101</b>	<b>130</b>	

Table 12. Comparative results for *Ureaplasma urealyticum*.

\*The low amount of template DNA in these genitourinary samples is below the detection limit of the method used. ‡ 2/4 samples were confirmed by routine diagnosis as positive. # 1/3 identified positive by routine diagnosis.

Sexually Transmitted Diseases Reaction mix	FTD Urethritis plus (Fast Track Diagnostics)			
		+	-	Total
	+	53	16*	69
	-	0	61	61
<b>Total</b>	<b>53</b>	<b>77</b>	<b>130</b>	

Table 13. Comparative results for *Ureaplasma parvum*.

\*The low amount of template DNA in these genitourinary samples is below the detection limit of the method used. These Real Time assays might show different analytical sensitivity.



Sexually Transmitted Diseases Reaction mix	FTD Urethritis plus (Fast Track Diagnostics)			Total
		+	-	
	+	51	0	51
	-	1*	78	79
Total	52	78	130	

Table 14. Comparative results for *Mycoplasma hominis*.

\*The low amount of template DNA in these genitourinary samples is below the detection limit of the method used.

The clinical performance of *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Treponema pallidum* Reaction mix was tested using 8 endocervical swabs from symptomatic patients. The comparison was carried out using the results obtained from the routine analysis performed in the hospital with the molecular detection method "CLART® ENTHERPEX" (Genómica). Two samples were HSV-1 positive and 6 were detected as HSV-2 positive. The concordance of both kits was 100%. The clinical performance of *Herpes virus 1*, *Herpes virus 2* & *Treponema pallidum* Reaction mix was tested using 89 samples from QCMD, UK NEQAS and INSTAND EQA programs. These samples included urine, plasma, cell lysates, synthetic CSF, genital, anal or oropharyngeal ulcer-causing pathogens. These results were compared with those obtained with a molecular detection method (FTD Genital ulcer (Fast Track Diagnostics)) and/or with the corresponding reports. All samples were detected correctly. 23/81 were HSV-1 positive, 21/81 were HSV-2 positive and 15/81 were *Treponema pallidum* positive.

The clinical performance of *C. albicans*, *G. vaginalis* & *T. vaginalis* Reaction mix was tested using QCMD EQA programs, and the results were compared with the corresponding reports. The clinical performance for *Candida albicans* was tested with the QCMD 2017 *Candida* spp. EQA Programme and QCMD 2017 Immunocompromised EQA Pilot Study. All *C. albicans* samples (7 samples positives) were properly detected. Other species of *Candida*, including *C. glabrata*, *C. parapsilopsis*, and *C. Krusei*, as well as *Candida* negative samples were reported as negative, and other opportunistic microorganisms but pathogens for immunocompromised patients as *Pneumocystis jirovecii*, *Aspergillus fumigatus*, and JC virus were reported as negative. The clinical performance for *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis* was tested with the QCMD 2017 Sexually Transmitted Infections I EQA Pilot Study and the QCMD 2018 *Trichomonas vaginalis* EQA Pilot Study. All *G. vaginalis* (2 samples positives) and *T. vaginalis* (9 samples positives) samples were properly detected. Other sexually transmitted pathogens including *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum*, as well as negative samples were reported as negative.

The results show a high sensitivity and specificity to detect *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum* and *M. hominis*; HSV 1, HSV 2 and *T. pallidum*; *C. albicans*, *G. vaginalis* and *T. vaginalis*; using VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit.

## 12.2. Analytical sensitivity

VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of  $\geq 10$  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*, *G. vaginalis* and *T. vaginalis*.



### 12.3. Analytical specificity

The specificity of the *Sexual Health Panel I* assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common enteric and genitourinary pathogens or flora present in the gastrointestinal tract or urogenital system. 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> 0.1285; O18:H7:K1	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-/+	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Candida krusei</i>	-	<i>Haemophilus 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> (LGV)	-/+	<i>Listeria innocua</i>	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-/+
<i>Chlamydia trachomatis</i> (SW)	-/+	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-/+	Cytomegalovirus	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> (Genovar F)	-/+	<i>Mycoplasma hominis</i>	-/+	Herpes simplex virus 1	-/+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-/+	Herpes simplex virus 2	-/+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	Human papillomavirus 16	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-	Human papillomavirus 18	-

Table 27. Reference pathogenic microorganisms used in this study

### 12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit for **Sexually Transmitted Diseases Reaction mix** (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* & *Mycoplasma genitalium* and *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* & *Mycoplasma hominis*) was evaluated against *Neisseria gonorrhoeae* (*Neisseria gonorrhoeae* strains St 49226 and Lvl Ng PorA), *Chlamydia trachomatis* (*Chlamydia trachomatis* (SW and LGV), Swedish strain, and Genovar F, and Serovars D, E, I, K and J), *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma hominis*, showing positive result.

The reactivity of VIASURE **Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Treponema pallidum Reaction mix**, was evaluated against *Herpes virus 1* (HSV 1 MacIntyre strain), *Herpes virus 2* (HSV 2 MS strain) and *Treponema pallidum*, showing positive result.

The reactivity of VIASURE **C. albicans, G. vaginalis & T. vaginalis Reaction mix**, was evaluated against *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis*, 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 <sup>(1)</sup>
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>
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 <sup>(5)</sup>
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>
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 <sup>(6)</sup>
Cepheid	SmartCycler® <sup>(3)</sup>
Qiagen	Rotor-Gene® Q <sup>(3)</sup>
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System <sup>(4)</sup>
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System <sup>(4)</sup>
Roche	Cobas z480 Analyzer <sup>(4)</sup>

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Abbott	Abbottm2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 <sup>(6)</sup>
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 <sup>(5)</sup>
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 <sup>(5)</sup>
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 <sup>(6)</sup>
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System <sup>(6)</sup>
Cepheid	SmartCycler® <sup>(3)</sup>
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler <sup>(2)</sup>
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System <sup>(2)</sup>
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q <sup>(3)</sup>
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System <sup>(2)</sup>
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System <sup>(2)</sup>

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

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



## ANNEX 3

**OPTICAL MEASUREMENT EXPOSURE SETTING**

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

Universal exposition values are as follow:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) and VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel -1000, HEX channel – 1000, ROX channel – 1000 and Cy5 channel -1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) and VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel - 500, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel – 500.

For "VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit", it is recommend set the 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 *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y/o *Mycoplasma hominis*; Herpes virus 1, Herpes virus 2 y/o *Treponema pallidum*; *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* y/o *Trichomonas vaginalis* en muestras urogenitales, muestras de orina y muestras rectales procedentes de pacientes con signos y síntomas de enfermedad de transmisión sexual. 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 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*, *G. vaginalis* y *T. 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. Los agentes etiológicos responsables de las ITS incluyen hongos, bacterias, parásitos y virus. Algunos de estos microorganismos son eliminados al cabo de un período de tiempo, mientras que otros son recurrentes y se mantienen en el organismo de forma asintomática, permitiendo el progreso de la enfermedad y generando consecuencias como inflamaciones del tracto genito-urinario, infertilidad e incluso el desarrollo de cáncer.

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

*Mycoplasma hominis* coloniza el tracto urogenital inferior y se asocia con infecciones urogenitales, particularmente vaginosis bacteriana y uretritis no gonocócica. También está involucrado en infecciones genitales adicionales, como la fiebre posparto o posterior al aborto, en infecciones de heridas posteriores a la cesárea o después de una histerectomía. En los recién nacidos, puede causar meningitis, abscesos cerebrales e infecciones oculares. En adultos, se han descrito bacteriemia, artritis séptica, osteítis, endocarditis, mediastinitis, abscesos cerebrales e infecciones respiratorias. La mayoría de los pacientes tienen factores predisponentes, que incluyen inmunosupresión, trauma, problemas respiratorios o post-manipulación y/o cirugía del tracto genitourinario. Se considera una bacteria presente en la micro flora normal en el 20% de la población masculina y en el 40% de la población femenina.



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

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

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

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

El herpes genital puede ser causado por dos virus muy similares, el virus del herpes simple HSV-1 o HSV-2, siendo las infecciones causadas por el primero más frecuentes. Los virus del herpes simple (HSV) -1 y -2 son virus importantes, de DNA bicatenarios que causan infecciones persistentes (crónicas o latentes) caracterizadas por períodos de inactividad y enfermedad recurrente. Estos dos tipos de HSV no se pueden distinguir clínicamente. De hecho, comparten un alto grado de homología genética, aunque también tienen regiones específicas con pequeñas variaciones de nucleótidos que pueden permitir su discriminación. La infección por HSV-1 y HSV-2 ocurre a través de la inoculación de partículas virales en mucosas susceptibles. Posteriormente, estos virus neurotrópicos pueden volverse latentes en un ganglio sensorial local, reactivarse periódicamente para causar lesiones sintomáticas, o experimentar una liberación viral asintomática, con el potencial de transmisión de la enfermedad e infección. El mismo tratamiento se usa para las infecciones producidas por HSV-1 y HSV-2, la



ubicación de las lesiones y la cronicidad de la infección (primaria o recurrente) determinan la dosis y la frecuencia.

La espiroqueta *Treponema pallidum*, el agente etiológico de la sífilis, causa una infección de transmisión sexual (ITS) de múltiples etapas. Los treponemas patogénicos causan sífilis venérea, frambesia, sífilis endémica y pinta multietapa, infecciones que, aunque similares, pueden diferenciarse según criterios clínicos, epidemiológicos y geográficos. Solo la sífilis venérea se transmite por actividad sexual. Los treponemas son microorganismos de crecimiento lento, no cultivables, con morfologías alargada, muy delgada y de disposición en espiral. Toleran mal la desecación, una temperatura elevada y una elevada tensión de oxígeno ambiental, rasgos que explican por qué la transmisión eficiente requiere un contacto personal cercano.

*Candida albicans*, es un patógeno fúngico oportunista común que habita en las superficies de la mucosa humana, puede causar infecciones fúngicas, especialmente en pacientes quirúrgicos, inmunocomprometidos y de alto riesgo. Aunque *Candida albicans* sigue siendo la principal especie aislada de muestras clínicas en la mayoría de los individuos, es bien sabido que las infecciones por algunas otras especies de *Candida* no *albicans*, tales como *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* y *Candida tropicalis* están muy extendidas.

*Gardnerella vaginalis* es una bacteria anaeróbica Gram-variable facultativa que pertenece a la familia *Bifidobacteriaceae* y es la especie dominante involucrada en la vaginosis bacteriana (VB). Aunque la VB es una afección polimicrobiana sin un solo agente causal, el 100% de las mujeres con VB están colonizadas con *G. vaginalis*. *G. vaginalis* también es un comensal normal de la microflora vaginal en mujeres sanas.

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

### 3. Procedimiento

VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación de *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum* y/o *M. hominis*; HSV 1, HSV 2 y/o *T. pallidum*; *C. albicans*, *G. vaginalis* y/o *T. vaginalis* en muestras urogenitales, muestras de orina y muestras rectales. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum* y/o *M. hominis*; HSV 1, HSV 2 y/o *T. pallidum*; *C. albicans*, *G. vaginalis* y/o *T. vaginalis* se realiza mediante la amplificación de una región conservada de los genes específicos (Tabla 3, Patógenos detectados en cada tubo de reacción y genes diana) utilizando oligonucleótidos específicos y sondas marcadas con fluorescencia.

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 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 (si está presente). Cada diana de DNA se amplifica y detecta en canales específicos (FAM, HEX, ROX y Cy5) y el control interno (CI) en los canales HEX, VIC o JOE y/o Cy5 (si está presente) (seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, ver Anexo 2) (Tabla 5).

#### 4. Reactivos suministrados

VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1 y 2:

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Sexual Health Panel I</i> 8-well strips (2 reacciones Hyperplex por tira)	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno (si está presente) en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Sexual Health Panel I</i> Positive Control	cDNA/DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones


Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-SP0112L y VS-SP0112H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Sexual Health Panel I</i> 96-well plate (2 reacciones Hyperplex por tira)	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno (si está presente) en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Sexual Health Panel I</i> Positive Control	cDNA/DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-SP0113L y VS-SP0113H.

La tira de 8 pocillos (2 Hyperplex) de VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo las siguientes mezclas de reacción para la detección de las dianas específicas (Tabla 3).





	Código	Controles	Mezcla de reacción localizada dentro de cada pocillo Patógenos y genes diana
1	NMT	IC	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> & <i>Mycoplasma genitalium</i>
			<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ( <i>porA</i> and <i>Opa</i> genes), <i>Chlamydia trachomatis</i> (a region within ORF2 of the chlamydial plasmid) and <i>Mycoplasma genitalium</i> ( <i>MgPa adhesin</i> gene)
2	URE	-	<i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Ureaplasma parvum</i> & <i>Mycoplasma hominis</i>
			<i>Trichomonas vaginalis</i> ( <i>T. vaginalis</i> -specific 2-kb repeated sequence), <i>Ureaplasma urealyticum</i> and <i>Ureaplasma parvum</i> ( <i>ureasa</i> gene), <i>Mycoplasma hominis</i> ( <i>gidC</i> gene)
3	HHT	IC	<i>Herpes virus 1</i> , <i>Herpes virus 2</i> & <i>Treponema pallidum</i>
			<i>Herpes virus 1</i> ( <i>US4</i> gene), <i>Herpes virus 2</i> ( <i>US6</i> gene) and <i>Treponema pallidum</i> (16S rRNA gene)
4	CGT	IC	<i>C. albicans</i> , <i>G. vaginalis</i> & <i>T. vaginalis</i>
			<i>Trichomonas vaginalis</i> ( <i>T. vaginalis</i> -specific 2-kb repeated sequence), <i>Candida albicans</i> (5.8S rRNA gene) and <i>Gardnerella vaginalis</i> (16S rRNA gene)

Table 3. *Sexual Health Panel I* 8-well strips incluidas in VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit. Mezcla de reacción localizada dentro de cada pocillo, patógenos detectados y genes diana. CI, Control interno. Tenga en cuenta que la primera mezcla de reacción se coloca en los extremos de la tira.

## 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 *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de RNA/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 *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), 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 *Sexual Health Panel I* 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-SP0113L y VS-SP0113H). 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.
- **Tenga en cuenta que la primera mezcla de reacción se coloca en los extremos de la tira.**
- 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 clínicas puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

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

### 8.2. 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 200 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

### 8.3. Protocolo PCR

Determinar y separar el número de tiras 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. **Obsérvese que la primera mezcla de reacción se coloca en los extremos de la tira (Tabla 3) y cada tira incluye dos reacciones de Hyperplex, pocillos 1 a 4: mezclas de reacción de NMT, URE, HHT y CGT).**

- 1) Reconstituir el número de strips (reacciones Hyperplex) 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 *Sexual Health Panel* / Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) en los 8 pocillos de cada strip (reacción Hyperplex) 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	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 4. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (\*) a través de los canales FAM, ROX, Cy5 y/o HEX (JOE o VIC). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2).

Las mezclas de reacción situadas en cada pocillo de la tira de la Hyperplex permiten la detección específica de cada patógeno en los siguientes canales (Tabla 5).

Código	Canales				
	FAM	HEX	ROX	Cy5	
1	NMT	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Internal Control
2	URE	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
3	HHT	Herpes virus 1	Internal Control	Herpes virus 2	<i>Treponema pallidum</i>
4	CGT	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Internal Control	<i>Candida albicans</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
4	CGT	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Internal Control	<i>Candida albicans</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
3	HHT	Herpes virus 1	Internal Control	Herpes virus 2	<i>Treponema pallidum</i>
2	URE	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
1	NMT	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Internal Control

Tabla 5. Patógenos identificados en cada canal de detección.



## 9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo en cada run valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el control negativo de cada pocillo de la tira Hyperplex (4 pocillos) y la presencia de señal para el control positivo del *Sexual Health Panel I* de cada pocillo de la tira Hyperplex (4 pocillos). Comprobar la emisión de la señal del control interno (a excepción de la mezcla de reacción URE) 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.

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno (si lo presenta) 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 lo presenta) si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno (si lo presenta).

Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

	Reaction Mix	Patógenos	Canales			
			FAM	HEX	ROX	Cy5
1	NMT	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Positive			
		<i>Mycoplasma genitalium</i>		Positive		
		<i>Neisseria gonorrhoeae</i>			Positive	
		Internal Control				Positive/Negative
2	URE	<i>Trichomonas vaginalis</i> *	Positive			
		<i>Ureaplasma urealyticum</i>		Positive		
		<i>Ureaplasma parvum</i>			Positive	
		<i>Mycoplasma hominis</i>				Positive
3	HHT	Herpes virus 1	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
		Herpes virus 2			Positive	
		<i>Treponema pallidum</i>				Positive
4	CGT	<i>Trichomonas vaginalis</i> *	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
		<i>Candida albicans</i>			Positive	
		<i>Gardnerella vaginalis</i>				Positive

Tabla 6. Interpretación de la muestra Positivo: curva de amplificación. Vacío: sin curva de amplificación



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

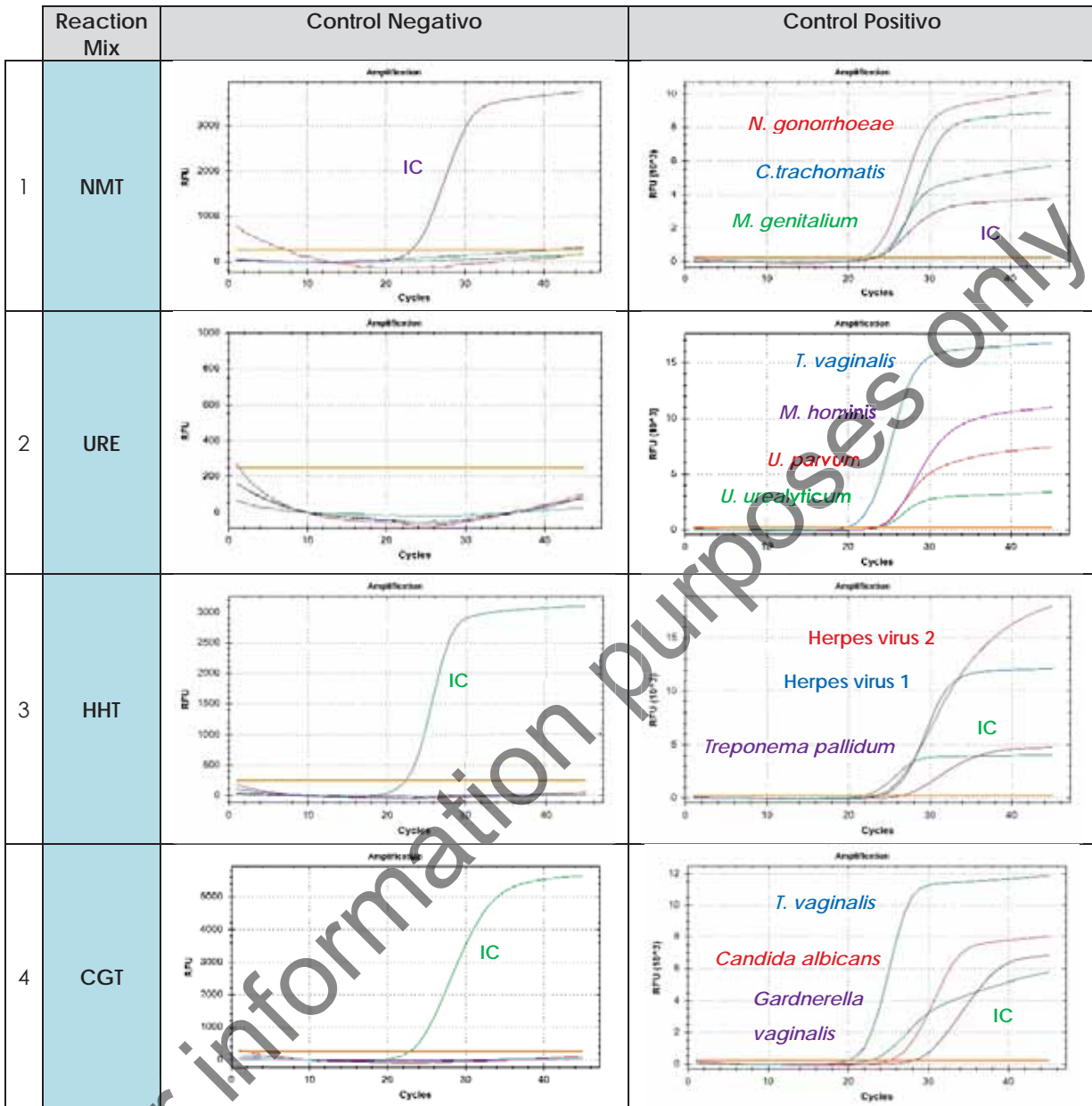


Table 7. Amplificación de control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.

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 (excepto en la mezcla de reacción URE), 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 hisopos de ETS (origen urogenital masculino o genital femenino), muestras endocervicales, muestras uretrales, muestras urogenitales, muestras rectales-vaginales, muestras rectales, muestras vaginales, muestras de orina, muestra de suero, muestras de semen y garganta (para NMT y URE); muestras en medio de transporte, hisopos endocervicales, orina, plasma, lisados celulares y CSF sintético (para HHT); y con frotis endocervical, vaginal y vagino-rectal, orina, plasma, lavado broncoalveolar (BAL) esputo, salino y muestras en medio de transporte (para CGT).
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico debe ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, *U. urealyticum*, *U. parvum* y/o *M. hominis*; HSV 1, HSV 2 y/o *T. pallidum*; *C. albicans*, *G. vaginalis* y/o *T. vaginalis* 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 *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) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica (excepción en la mezcla de reacción de URE).

## 12. Resultados preliminares de las características del test

### 12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

Se evaluaron 130 muestras diferentes (endocervicales, urogenitales, uretrales, vaginales, rectales vaginales, de orina, de suero, de semen y garganta) de pacientes sintomáticos utilizando **Sexually Transmitted Diseases Reaction mix** (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* & *Mycoplasma genitalium* y *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* & *Mycoplasma hominis*). Estos resultados se compararon con los obtenidos por un método de detección molecular (FTD Urethritis plus (Fast Track)).

Los resultados fueron los siguientes:



Sexually Transmitted Diseases Reaction mix	FTD Urethritis plus (Fast Track Diagnostics)			
		+	-	Total
	+	12	2*‡	14
	-	4*#	112	116
Total	16	114	130	

Table 8. Comparativa de resultados para *Neisseria gonorrhoeae*.

\* La baja cantidad de DNA molde detectado en esta muestra genitourinaria está por debajo del límite de detección del método utilizado. † 1/2 muestra fue confirmada por Seegene test como positiva. # Ninguna se identificó por el análisis rutinario.

Sexually Transmitted Diseases Reaction mix	FTD Urethritis plus (Fast Track Diagnostics)			
		+	-	Total
	+	37	4*‡	41
	-	3#	86	89
Total	40	90	130	

Table 9. Comparativa de resultados para *Chlamydia trachomatis*.

\* La baja cantidad de DNA molde detectado en esta muestra genitourinaria está por debajo del límite de detección del método utilizado. † 4/4 muestras fueron confirmadas por un análisis rutinario. # 2/3 identificadas por análisis rutinario.

Sexually Transmitted Diseases Reaction mix	FTD Urethritis plus (Fast Track Diagnostics)			
		+	-	Total
	+	7	0	7
	-	1*	122	123
Total	8	122	130	

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

\* La baja cantidad de DNA molde detectado en esta muestra genitourinaria está por debajo del límite de detección del método utilizado.

Sexually Transmitted Diseases Reaction mix	FTD Urethritis plus (Fast Track Diagnostics)			
		+	-	Total
	+	39	0	39
	-	3*#	88	91
Total	42	88	130	

Table 11. Comparativa de resultados para *Trichomonas vaginalis*.

\* La baja cantidad de DNA molde detectado en esta muestra genitourinaria está por debajo del límite de detección del método utilizado. # 2/3 identificadas por análisis rutinario

Sexually Transmitted Diseases Reaction mix	FTD Urethritis plus (Fast Track Diagnostics)			
		+	-	Total
	+	26	4*‡	30
	-	3*#	97	100
Total	29	101	130	

Table 12. Comparativa de resultados para *Ureaplasma urealyticum*.

\* La baja cantidad de DNA molde detectado en esta muestra genitourinaria está por debajo del límite de detección del método utilizado. † 2/4 muestras fueron confirmadas como positivas por medio de un análisis rutinario. # 1/3 identificadas como positivas por un análisis rutinario.



Sexually Transmitted Diseases Reaction mix	FTD Urethritis plus (Fast Track Diagnostics)			
		+	-	Total
	+	53	16*	69
	-	0	61	61
Total	53	77	130	

Table 13. Comparativa de resultados para *Ureaplasma parvum*.

\* La baja cantidad de DNA molde detectado en esta muestra genitourinaria está por debajo del límite de detección del método utilizado. Estos ensayos en tiempo real pueden mostrar diferente sensibilidad analítica.

Sexually Transmitted Diseases Reaction mix	FTD Urethritis plus (Fast Track Diagnostics)			
		+	-	Total
	+	51	0	51
	-	1*	78	79
Total	52	78	130	

Table 14. Comparativa de resultados para *Mycoplasma hominis*.

\* La baja cantidad de DNA molde detectado en esta muestra genitourinaria está por debajo del límite de detección del método utilizado.

**Herpes virus 1, Herpes virus 2 y Treponema pallidum Reaction mix** fue evaluado utilizando 8 hisopos endocervicales de pacientes sintomáticos. La comparación se llevó a cabo utilizando los resultados obtenidos del análisis de rutina realizado en el hospital con el método de detección molecular "CLART® ENTHERPEX" (Genómica). 2 muestras fueron positivas a HSV-1 y 6 fueron detectadas como positivas a HSV-2. La concordancia de ambos kits fue del 100%. **Herpes virus 1, Herpes virus 2 y Treponema pallidum Reaction mix** fue evaluado utilizando 89 muestras de los programas EQA QCMD, UK NEQAS e INSTAND. Estas muestras incluyeron orina, plasma, lisados celulares, CSF sintético y patógenos genitales, anales u orofaríngeos que causan úlceras. Estos resultados se compararon con los obtenidos con un método de detección molecular (FTD Genital ulcer (Fast Track Diagnostics)) y/o con los informes correspondientes. Todas las muestras fueron detectadas correctamente. 23/81 fueron HSV-1 positivos, 21/81 fueron HSV-2 positivos y 15/81 fueron *Treponema pallidum* positivas.

**C. albicans, G. vaginalis & T. vaginalis Reaction mix** fue evaluado frente a los programas EQA de QCMD, y los resultados se compararon con los informes correspondientes. El rendimiento clínico de *Candida albicans* se probó con QCMD 2017 *Candida* spp. EQA Programme y QCMD 2017 Immunocompromised EQA Pilot Study. Todas las muestras de *C. albicans* (7 muestras positivas) fueron detectadas adecuadamente. Otras especies de *Candida*, incluyendo *C. glabrata*, *C. parapsilopsis* y *C. krusei*, así como las muestras negativas para *Candida* se informaron como negativas, y otros microorganismos oportunistas, pero patógenos para pacientes inmunocomprometidos como *Pneumocystis jirovecii*, *Aspergillus fumigatus* y virus JC fueron reportados como negativos. El rendimiento clínico de *Gardnerella vaginalis* y *Trichomonas vaginalis* se probó con QCMD 2017 Sexually Transmitted Infections I EQA Pilot Study y QCMD 2018 *Trichomonas vaginalis* EQA Pilot Study. Todas las muestras de *G. vaginalis* (2 muestras positivas) y *T. vaginalis* (9 muestras positivas) fueron detectadas adecuadamente. Otros patógenos de transmisión sexual como *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* y *Ureaplasma urealyticum*, así como las muestras negativas se notificaron como negativas.



Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad 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*, *G. vaginalis* y *T. vaginalis*; utilizando VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit.

## 12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de  $\geq 10$  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*, *G. vaginalis* y *T. vaginalis*.

## 12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo Sexual Health Panel I fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos entéricos y genitourinarios más comunes presentes en el tracto gastrointestinal o en el sistema urogenital. No se detectó reactividad cruzada entre casi ninguno de los siguientes microorganismos probados, excepto los patógenos específicos de cada ensayo.

Prueba de reacción cruzada					
<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. aureus	-
<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> (LGV)	-/+	<i>Listeria innocua</i>	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-/+
<i>Chlamydia trachomatis</i> (SW)	-/+	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-/+	Cytomegalovirus	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> (Genovar F)	-/+	<i>Mycoplasma hominis</i>	-/+	Virus del Herpes simple 1	-/+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-/+	Virus del Herpes simple 2	-/+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	Papillomavirus humano 16	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-	Papillomavirus humano 18	-

Tabla 27. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

## 12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE Sexual Health Panel I Real Time PCR Detection Kit para **Sexually Transmitted Diseases Reaction mix** (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* & *Mycoplasma genitalium* y *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* & *Mycoplasma hominis*), se evaluó frente a *Neisseria gonorrhoeae* (*Neisseria gonorrhoeae* cepa St 49226 y Lvl Ng PorA), *Chlamydia trachomatis* (*Chlamydia trachomatis* (SW y LGV) cepas Swedish, Genovar F, y Serovares D, E, I, K y J), *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* y *Mycoplasma hominis*.





*Herpes virus 1, Herpes virus 2 & Treponema pallidum Reaction mix*, se evaluó frente a Virus Herpes 1 (cepa HSV 1 MacIntyre), Virus Herpes 2 (cepa HSV 2 MS) y Treponema pallidum.

*C. albicans, G. vaginalis & T. vaginalis Reaction mix*, se evaluó frente a Candida albicans, Gardnerella vaginalis y Trichomonas vaginalis.

### 13. Bibliography/Bibliografía











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



15. D. Férandon *et al.* Development of a real-time PCR targeting the *yidC* gene for the detection of *Mycoplasma hominis* and comparison with quantitative culture. *Clinical Microbiology and Infection* 2011; 17(2): 155-159.
16. J. D. Radolf *et al.* *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete: making a living as a stealth pathogen. *Nature Reviews Microbiology* 2016; 14(12): 744–759.
17. M. Lieveld *et al.* A high resolution melting (HRM) technology-based assay for cost-efficient clinical detection and genotyping of herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2. *Journal of Virological Methods* 2017; Volume 248, 181-186.
18. M. Costa-Silva *et al.* Cross-sectional study of *Treponema pallidum* PCR in diagnosis of primary and secondary syphilis. *International Journal of Dermatology* 2017; doi: 10.1111/ijd.13823.
19. M.A. Minaya *et al.* Molecular evolution of herpes simplex virus 2 complete genomes: Comparison between primary and recurrent infections. *American Society for Microbiology* 2017; doi:10.1128/JVI.00942-17.
20. C.O. Onyango *et al.* Evaluation of a TaqMan Array Card for Detection of Central Nervous System Infections. *Journal of Clinical Microbiology* 2017 Jul;55(7): 2035-2044.
21. A. K. Wendel *et al.* *Trichomonas vaginalis* Polymerase Chain Reaction Compared with Standard Diagnostic. *Clinical Infectious Diseases* 2020; 35:576-80.
22. G. Kusdian *et al.* The biology of *Trichomonas vaginalis* in the light of urogenital tract infection. *Molecular and Biochemical Parasitology Journal* (2015).
23. J. Schirm *et al.* *Trichomonas vaginalis* detection using real-time TaqMan PCR. *Journal of Microbiological Methods* 2007; 243-247.
24. H. Fukumoto *et al.* Development of a new real-time PCR system for simultaneous detection of bacteria and fungi in pathological samples. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2015; 8(11):15479-15488.
25. C. Cox *et al.* New assay for *Gardnerella vaginalis* loads correlates with Nugent scores and has potential in the diagnosis of bacterial vaginosis. *Journal of Medical Microbiology* 2015; 64, 978–984.
26. J.G. Kusters *et al.* A multiplex real-time PCR assay for routine diagnosis of bacterial vaginosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2015; 34:1779–1785.
27. Y. Gong *et al.* *Candida albicans* Heat Shock Proteins and Hsps-Associated Signaling Pathways as Potential Antifungal Targets. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2017; 7:520.
28. M. Shirani *et al.* Chemical composition and antifungal effect of hydroalcoholic extract of *Allium tripedale* (Tvautev.) against *Candida* species. *Current Medical Mycology* 2017; (1): 6–12.



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

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

For information purposes only



## 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 <sup>(1)</sup>
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>
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 <sup>(5)</sup>
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>
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 <sup>(6)</sup>
Cepheid	SmartCycler® <sup>(3)</sup>
Qiagen	Rotor-Gene® Q <sup>(3)</sup>
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System <sup>(4)</sup>
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System <sup>(4)</sup>
Roche	Cobas z480 Analyzer <sup>(4)</sup>

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbottm2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 <sup>(6)</sup>
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 <sup>(5)</sup>
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 <sup>(5)</sup>
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
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 <sup>(6)</sup>
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System <sup>(6)</sup>
Cepheid	SmartCycler® <sup>(3)</sup>
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler <sup>(2)</sup>
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System <sup>(2)</sup>
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q <sup>(3)</sup>
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System <sup>(2)</sup>
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System <sup>(2)</sup>

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

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



## ANEXO 3

**CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN**

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

Los valores de exposición universales son los siguientes:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -1000, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 – 500.

Para "VIASURE *Sexual Health Panel I* Real Time PCR Detection Kit", se recomienda ajustar 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.



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

Revision: January 2019

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](http://www.certest.es)



VIASURE online

F-362 rev01

**VIASURE**



Real Time PCR Detection Kits

**CerTest**  
BIOTEC