











































### 8.3. Protocolo PCR

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

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

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

- 2) Añadir muestras y controles.

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

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

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

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

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

Tabla 3. Protocolo PCR

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

## 9. Interpretación de resultados

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



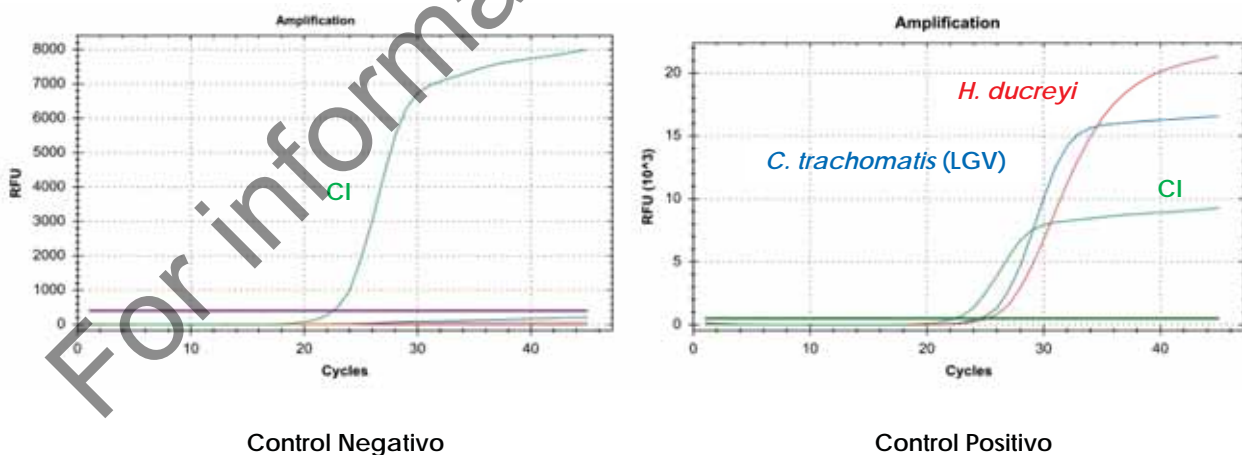
<i>C. trachomatis</i> (LGV)(FAM)	<i>H. ducreyi</i> (ROX)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	<i>C. trachomatis</i> (LGV) y <i>H. ducreyi</i> Positivos
-	-	+	-	+	<i>C. trachomatis</i> (LGV) y <i>H. ducreyi</i> Negativos
+	-	+/-	-	+	<i>C. trachomatis</i> (LGV)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

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

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

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

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



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

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



## 10. Limitaciones del test

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

## 11. Control de calidad

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

## 12. Resultados preliminares de las características del test

### 12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

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

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



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

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

## 12.2. Sensibilidad analítica

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

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

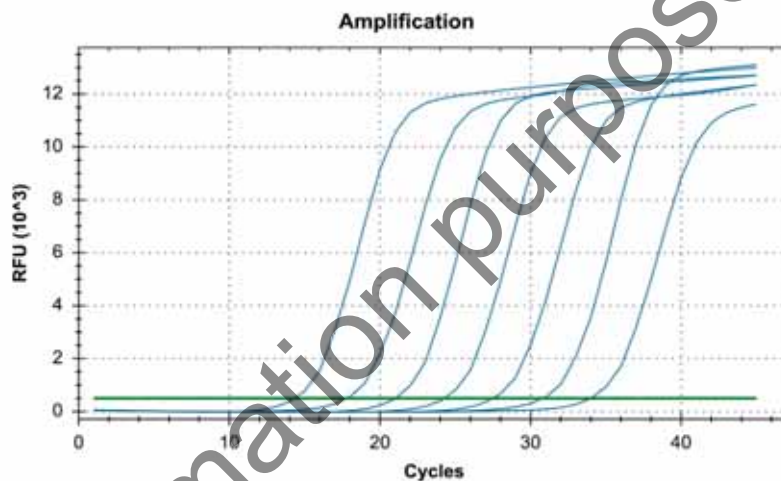
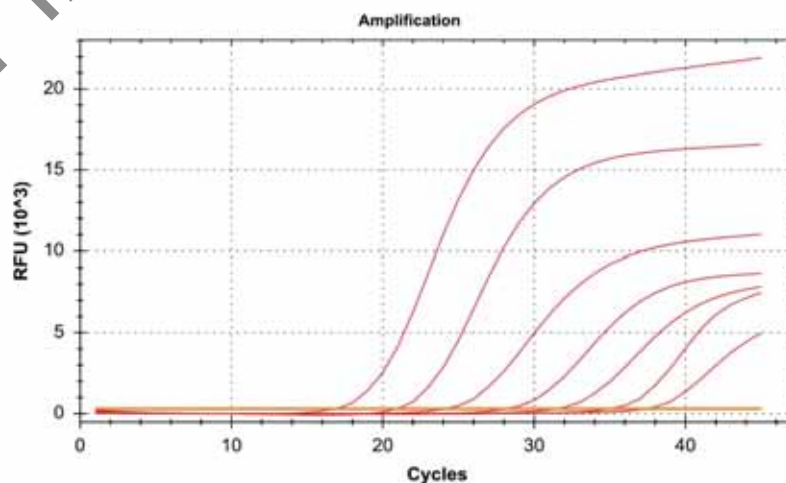


Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar *H. ducreyi* ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal ROX).



### 12.3. Especificidad analítica

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

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

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

### 12.4. Reactividad analítica

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

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

## 13. Bibliography/Bibliografía











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





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

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

 <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>



## 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>

(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 A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System <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>

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



## ANEXO 2

## CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

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

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

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



## ANEXO 3

**CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN**

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

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

For information purposes only



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

Revision: October 2018

For information purposes only



For information purposes only



For information purposes only



For information purposes only



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



VIASURE online

F-349 rev00

**VIASURE**



Real Time PCR Detection Kits

**CerTest**  
BIOTEC