

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

Treponema pallidum

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

VIASURE <i>Treponema pallidum</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-TPA106L
VIASURE <i>Treponema pallidum</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-TPA106H
VIASURE <i>Treponema pallidum</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-TPA112L
VIASURE <i>Treponema pallidum</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-TPA112H
VIASURE <i>Treponema pallidum</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-TPA113L
VIASURE <i>Treponema pallidum</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-TPA113H

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit is designed for detection of *Treponema pallidum* in urogenital specimens from patients with signs and symptoms of sexually transmitted diseases. This test is intended to be used as an aid in the diagnosis of *Treponema pallidum* in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from specimens, multiplied using Real Time amplification and detected using fluorescent reporter dye probe specific for *Treponema pallidum*.

2. Summary and Explanation

The spirochete *Treponema pallidum* (Tp), 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.

Several types of laboratory test are available for diagnosis of *Treponema pallidum*. Serology, dark field microscopy and PCR are the gold standards to diagnose this pathogen. However, Real Time PCR assays have been shown to be a more sensitive and specific diagnosis tool for its detection.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of *Treponema pallidum* in urogenital samples. After DNA isolation, the identification of *Treponema pallidum* is performed by the amplification of a conserved region of the 16S rRNA gene for *Treponema pallidum*, using specific primers and a fluorescent-labelled probe.

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

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



4. Reagents provided

VIASURE *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1 and Table 2:

Reference	Reagent/Material	Description	Colour	Amount
VS-TPA1SL/ VS-TPA1SH	<i>Treponema pallidum</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	6/12 x 8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-TPA1C	<i>Treponema pallidum</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 X 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-TPA106L, VS-TPA106H, VS-TPA112L and VS-TPA112H.

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-TPA1PL/ VS-TPA1PH	<i>Treponema pallidum</i> 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-TPA1C	<i>Treponema pallidum</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-TPA113L and VS-TPA113H.

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 *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler) (to check compatibility see Annex I).
- DNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes.
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.



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.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- 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.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different kits and/or lots.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

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 specimens or culture 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.
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).



8.2. Lyophilized positive control

Treponema pallidum 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 *Treponema pallidum* Positive Control (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

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

8.3. PCR protocol

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

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

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

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *Treponema pallidum* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps. Centrifuge briefly.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up your thermocycler.

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

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

Table 3. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*Treponema pallidum*) and HEX, JOE or VIC channels (CI). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005PT™ Real Time PCR System check that the passive reference option for ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.



9. Result interpretation

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

Using the following table read and analyze the results:

<i>Treponema pallidum</i> (FAM)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+/-	-	+	<i>Treponema pallidum</i> Positive
-	+	-	+	<i>Treponema pallidum</i> Negative
-	-	-	+	Experiment fail
+	+	+	-	Experiment fail

Table 4. Sample interpretation

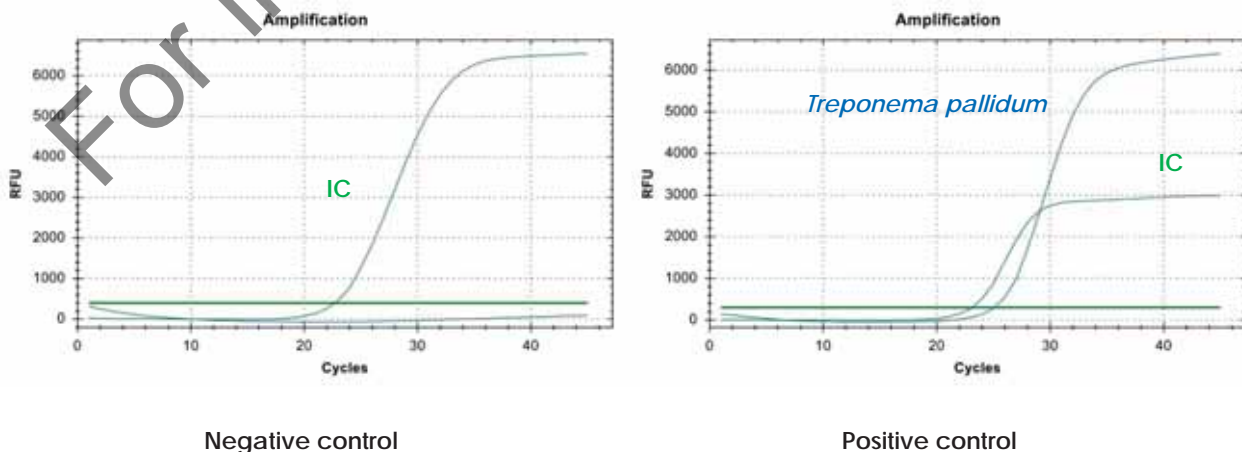
+: Amplification curve

-: No amplification curve

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

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

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



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

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

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples, it has been validated only with vaginal-rectal swabs, urine, samples in transport medium, and liquid based cytology (cervical cells which are collected and then are suspended in a preservative media).
- 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 *Treponema pallidum* either by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

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

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

VIASURE *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit was evaluated with QCMD 2017 Syphilis EQA Programme and QCMD 2017 Sexually Transmitted Infections I EQA Pilot Study. These panels consist of 17 clinical specimens in transport medium, urine and swabs. These samples included other Sexually Transmitted Infection causing pathogens. These results were compared with the EQA program final reports. 8 positive samples for *Treponema pallidum* samples could be detected. In addition, the samples which contained *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, and Herpes Simplex Virus 2, were confirmed as *Treponema pallidum* negative.

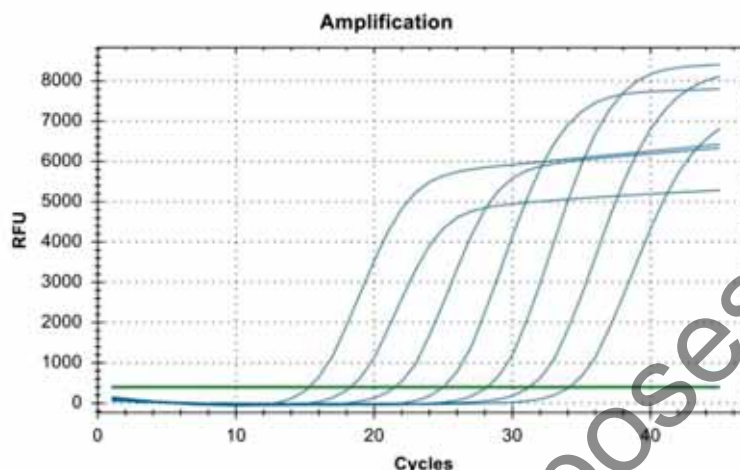
In conclusion, the results show a high sensitivity and specificity to detect *Treponema pallidum* using VIASURE *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit.



12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction for *Treponema pallidum* (Figure 2).

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



12.3. Analytical specificity

The specificity of the *Treponema pallidum* 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 any of the following microorganisms tested.

Cross-reactivity testing					
<i>Candida parapsilosis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	<i>E. 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>Trichomonas vaginalis</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Listeria ivanovii</i>	-	<i>Ureaplasma parvum</i>	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV)	-	<i>Listeria innocua</i>	-	Cytomegalovirus AD-169	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> (SW)	-	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	Herpes simplex virus 1	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> genovar F	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-	Herpes simplex virus 2	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	Human papillomavirus 16	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	Human papillomavirus 18	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-		

Table 5. Reference pathogenic microorganisms used in this study.



12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit was evaluated against *Treponema pallidum*, showing positive result.

For information purposes only



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 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiATM™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁴⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
BIONEER	Exicycler™ 96
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Abbott	Abbotm2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiATM™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

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

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



ANNEX 2

DETECTION CHANNELS FOR THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

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

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	VIASURE CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation is required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

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



ANNEX 3

OPTICAL MEASUREMENT EXPOSURE SETTING

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

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

For information purposes only



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección de específica de *Treponema pallidum* en muestras urogenitales procedentes de pacientes con signos y síntomas de enfermedades de transmisión sexual. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por *Treponema pallidum* en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de las muestras, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar *Treponema pallidum*.

2. Introducción y explicación

La espiroqueta *Treponema pallidum* (Tp), 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.

Están disponibles varios tipos de pruebas de laboratorio para el diagnóstico de *Treponema pallidum*. La serología, la microscopía de campo oscuro y la PCR son *gold-standard* para diagnosticar este patógeno. Sin embargo, los ensayos de PCR en tiempo real han demostrado ser una herramienta de diagnóstico más sensible y específica para su detección.

3. Procedimiento

VIASURE *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de *Treponema pallidum* en muestras clínicas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *Treponema pallidum* se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan en una región conservada del gen 16S rRNA para *Treponema pallidum*.

VIASURE *Treponema pallidum* 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 *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras



la reacción de amplificación *Treponema pallidum* se detecta en el canal FAM y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1 y 2:

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-TPA1SL/ VS-TPA1SH	<i>Treponema pallidum</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-TPA1C	<i>Treponema pallidum</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-TPA106L, VS-TPA106H, VS-TPA112L y VS-TPA112H.

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-TPA1PL/ VS-TPA1PH	<i>Treponema pallidum</i> 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-TPA1C	<i>Treponema pallidum</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-TPA113L y VS-TPA113H.

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 *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador) (para comprobar la compatibilidad ver Anexo I).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL.



- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

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.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

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



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

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).

8.2. Control positivo liofilizado

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

8.3. Protocolo PCR

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

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

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

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *Treponema pallidum* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador.

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 (*Treponema pallidum*) 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 y Stratagene Mx3005PT™ 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 *Treponema pallidum*. 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>Treponema pallidum</i> (FAM)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+/-	-	+	<i>Treponema pallidum</i> Positivo
-	+	-	+	<i>Treponema pallidum</i> Negativo
-	-	-	+	Inválido
+	+	+	-	Inválido

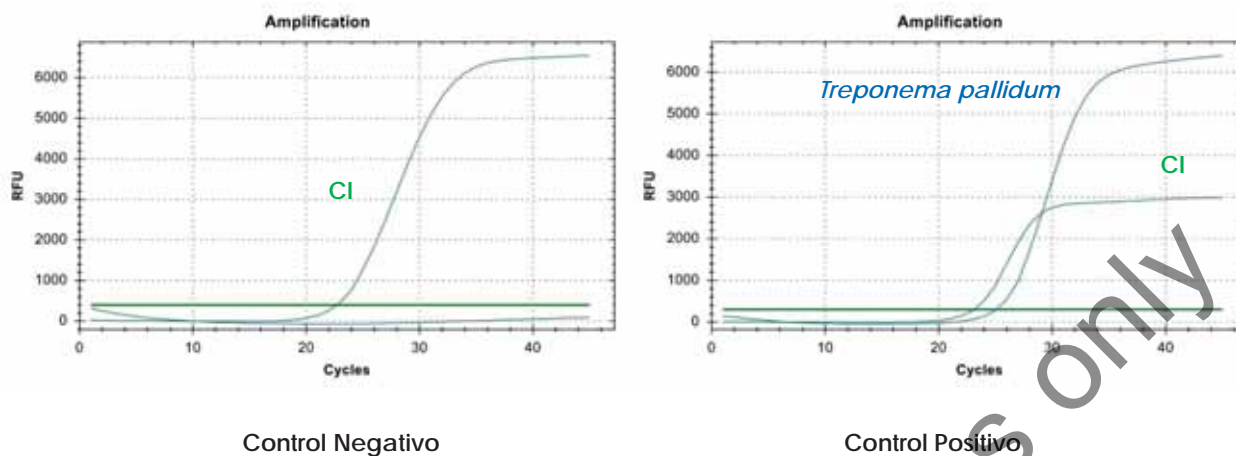
Tabla 4. Interpretación
 +: curva de amplificación
 -: sin curva de amplificación

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

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con muestras de frotis vaginal-rectal, orina, muestras en medio de transporte, y citología en base líquida (células cervicales que se recogen y luego se suspenden en un medio conservante).
- 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 *Treponema pallidum* 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 *Treponema pallidum* 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. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

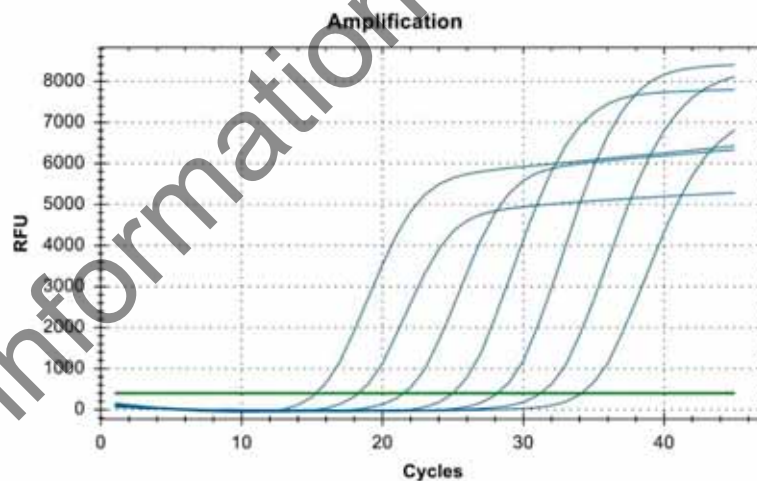
VIASURE *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit se evaluó con 2 paneles, QCMD 2017 Syphilis EQA Programme y QCMD 2017 Sexually Transmitted Infections I EQA Pilot Study. Estos paneles se componen de 17 muestras clínicas en medio de transporte, orinas y frotis. Estas muestras incluyeron otros patógenos causales de Enfermedades de Transmisión Sexual. Los resultados se compararon con los informes finales de los programas EQA. Ocho muestras positivas para *Treponema pallidum* pudieron ser detectadas. Además las muestras que contenían *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, y Herpes Simplex Virus 2, fueron confirmados como *Treponema pallidum* negativo.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Treponema pallidum*; utilizando VIASURE *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción para *Treponema pallidum*. (Figura 2).

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



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *Treponema pallidum* fue confirmada probando un panel compuesto patógenos entéricos y genitourinarios más comunes o la flora presente en el tracto gastrointestinal o en el sistema urogenital. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados.



Prueba de reacción cruzada					
<i>Candida parapsilosis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	<i>E. 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 influenza</i> MinnA	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
<i>Candida dubliniensis</i>	-	<i>Haemophilus ducreyi</i> clase 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>Trichomonas vaginalis</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Listeria ivanovii</i>	-	<i>Ureaplasma parvum</i>	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV)	-	<i>Listeria innocua</i>	-	Cytomegalovirus AD-169	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> (SW)	-	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	Virus del Herpes simple 1	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> genovar F	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-	Virus del Herpes simple 2	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	Virus del papiloma humano 16	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	Virus del papiloma humano 18	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-		

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

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a *Treponema pallidum*, mostrando un resultado positivo.

13. Bibliography/Bibliografía

1. 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.
2. 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.



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 <n> test Contiene <n> 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 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiATM™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
BIONEER	Exicycler™ 96
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbotm2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiATM™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
 (2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.
 (3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.
 (4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.
 (5) No lectura en canal Cy5.
 (6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

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



ANEXO 2

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

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

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	
	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



VIASURE *Treponema pallidum* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology 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).

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

- 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.



For information purposes only

CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1

50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

www.certest.es



VIASURE online

F-362 rev00

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC