

Vitassay qPCR

Genital ulcer

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de Virus Herpes simple 1, Virus Herpes simple 2 y *Treponema pallidum* en muestras humanas

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2 and *Treponema pallidum* in human samples



Uso previsto

Vitassay qPCR Genital ulcer, permite la detección y diferenciación del Virus del Herpes simple 1, Virus del Herpes simple 2 y *Treponema pallidum* mediante PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por los Virus del Herpes simple 1, Virus del Herpes simple 2 y *Treponema pallidum*.

Referencias

Vitassay qPCR Genital ulcer 4x8-well strip, low profile 7041036

Vitassay qPCR Genital ulcer 4x8-well strip, high profile 7042036

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S036/ 7042S036	Genital ulcer strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C036	Genital ulcer Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alcuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

Las úlceras genitales, anales y orofaríngeas están causadas por los virus del herpes simple tipo 1 y 2 y *Treponema pallidum*. Su detección es importante ya que estas úlceras son un factor de riesgo para la transmisión y adquisición del VIH. Existen diferentes tipos de pruebas para la detección de estos patógenos, como son la PCR y la serología. De estas, la PCR a tiempo real ha demostrado ser la herramienta más específica y sensible para la detección de los mismos.

La bacteria *Treponema pallidum* es la causante de la sífilis (venérea y endémica), la frambesia y la pinta. Aunque solo la sífilis venérea es de transmisión sexual, ya que requiere contacto personal cercano, debido a la poca tolerancia de estas a la desecación y a las temperaturas elevadas.

Los virus del herpes simple tipo 1 y 2 causan herpes genital e infecciones persistentes. No se pueden distinguir clínicamente y se usa el mismo tratamiento para las infecciones producidas por ambos virus. La dosis y la frecuencia la determinarán la ubicación de las lesiones y la cronicidad de la infección. Las infecciones por los virus del herpes simple tipo 1 y 2 ocurre a través de la inoculación de partículas virales en mucosas susceptibles. Gracias a la PCR en tiempo real se pueden detectar y diferenciar.

Principio del test

Vitassay qPCR Genital ulcer se basa en la amplificación a tiempo real de un fragmento de una región conservada de los genes *US4* y *US6* para Virus Herpes simple 1 y Virus Herpes simple 2, y el gen 16S rRNA para *Treponema pallidum*. Tras la extracción de DNA, la presencia de Virus Herpes simple 1, Virus Herpes simple 2 y *Treponema pallidum* se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

Vitassay qPCR Genital ulcer, se trata de un test *listo para usar* que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. La amplificación de la secuencia diana es detectada en el canal FAM (Virus Herpes simple 1), ROX (Virus Herpes simple 2) y Cy5 (*Treponema pallidum*) mientras que el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.

- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar 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.

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de DNA.

Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

ZP02012 MagPurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B, con MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec)

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Genital ulcer Positive Control (tubo rojo) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (Virus del Herpes simple 1), ROX (Virus del Herpes simple 2), Cy5 (*Treponema pallidum*) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast y Stratagene Mx3029P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

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.

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en los canales de los Virus del Herpes simple 1 (FAM), Virus del Herpes simple 2 (ROX) y *Treponema pallidum* (Cy5).

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de FAM, ROX y Cy5.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de la señal en el control positivo. El ensayo se debe de repetir.

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

Virus del Herpes simple 1	Virus del Herpes simple 2	<i>Treponema pallidum</i>	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	Virus del Herpes simple 1, Virus del Herpes simple 2 y <i>Treponema pallidum</i> Positivos
-	-	-	+	-	+	Virus del Herpes simple 1, Virus del Herpes simple 2 y <i>Treponema pallidum</i> Negativos
+	-	-	+/-	-	+	Virus del Herpes simple 1 Positivo, Virus del Herpes simple 2 y <i>Treponema pallidum</i> Negativos
+	+	-	+/-	-	+	Virus del Herpes simple 1 y Virus del Herpes simple 2 Positivos, <i>Treponema pallidum</i> Negativo
+	-	+	+/-	-	+	Virus del Herpes simple 1 y <i>Treponema pallidum</i> Positivos, Virus del Herpes simple 2 Negativo
-	+	-	+/-	-	+	Virus del Herpes simple 2 Positivo, Virus del Herpes simple 1 y <i>Treponema pallidum</i> Negativos
-	+	+	+/-	-	+	Virus del Herpes simple 2 y <i>Treponema pallidum</i> Positivos, Virus del Herpes simple 1 Negativo
-	-	+	+/-	-	+	<i>Treponema pallidum</i> Positivo, Virus del Herpes simple 1 y Virus del Herpes simple 2 Negativos
+	+	+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	-	-	Inválido

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

Si las muestras negativas para todos los patógenos no muestran un resultado positivo para el control interno, se debe repetir el ensayo diluyendo la muestra original 1:10 o repetir la extracción de los ácidos nucleicos debido a posibles problemas causados por inhibidores de PCR.

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

Un total de 33 muestras en medio de transporte (pertenecientes a programas EQA) de patógenos genitales, anales u orofaríngeos procedentes de pacientes sintomáticos fueron analizadas mediante Vitassay qPCR Genital ulcer y FTD Genital ulcer (Fast Track Diagnostics). Vitassay qPCR Genital ulcer detectó el Virus del Herpes simple 1 en 8 muestras, el Virus del Herpes simple 2 en 9 muestras y *Treponema pallidum* en 8 muestras.

Además, Vitassay qPCR Genital ulcer se evaluó con los siguientes programas: QCMD 2017 Central nervous system I EQA pilot study, QCMD 2017 Syphilis EQA programme (SYPH17) y QCMD 2017 enterovirus RNA EQA programme (EVRNA17). Los programas consistían en paneles de muestras (10 muestras, 8 muestras y 10 muestras, respectivamente) disueltas en medio de transporte. Estas muestras eran positivas o negativas a los patógenos de estudio. Vitassay qPCR Genital ulcer detectó correctamente todas las muestras de los diferentes paneles.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar el Virus del Herpes simple 1, el Virus del Herpes simple 2 y *Treponema pallidum* utilizando el test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR Genital ulcer.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del DNA molde de los diferentes patógenos (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA viral por reacción.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de Virus del Herpes simple 1, Virus del Herpes simple 2 y *Treponema pallidum* fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes patógenos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada

<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Escherichia coli</i> 0.1285; O18:H7:K1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Haemophilus ducrey</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Candida dubliniensis</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>Enterobacter cloacae</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	Hepatitis A
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Papillomavirus Humano genotipos HP16 and HPV18
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	

Reactividad analítica

Vitassay qPCR Genital ulcer ha sido evaluado para Virus del Herpes simple 1 con la cepa HSV 1 MacIntyre, obteniéndose un resultado positivo.

Vitassay qPCR Genital ulcer ha sido evaluado para Virus del Herpes simple 2 con la cepa HSV 2 MS obteniéndose un resultado positivo.

Vitassay qPCR Genital ulcer ha sido evaluado para *Treponema pallidum* frente a *Treponema pallidum* mostrando un resultado positivo.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Genital ulcer, ha sido probado en los siguientes equipos:

- LightCycler Z480, 480II (Roche)
- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

I: Para los equipos Rotor-Gene® Q y SmartCycler® el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de cada uno de los equipos.

II: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

Limitaciones

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por Virus del Herpes simple 1, Virus del Herpes simple 2 y *Treponema pallidum*. Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido probado en muestras de medio de transporte, hisopos endocervicales, orina, plasma, lisados celulares y CSF sintético. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas humanas. 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 del DNA 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 los diferentes patógenos, 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.

Adjunto I: Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil	Termocicladores con bloque de alto perfil
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Cepheid	Exicycler™ 96
SmartCycler®	Bio-Rad
Qiagen	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
LightCycler® 480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler® 96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	Cepheid
	SmartCycler®
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System*
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler*
	Eppendorf
	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Stratagene / Agilent Technologies
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

Adjunto II: Canales de detección de los equipos a tiempo real

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	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	
Smartcyler® 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	Al configurar los canales, 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	

Adjunto III: Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Intended use

Vitassay qPCR Genital ulcer allows the detection and differentiation of Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2 and *Treponema pallidum* by real-time PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2 and *Treponema pallidum* infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR Genital ulcer 4x8-well strip, low profile	7041036
Vitassay qPCR Genital ulcer 4x8-well strip, high profile	7042036

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S036/ 7042S036	Genital ulcer strips low/high profile	-	4x8-well strip
7C036	Genital ulcer Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4x8 cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. In order to avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Additional equipment and material required

- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortexer
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Genital, anal and oropharyngeal ulcers are caused by herpes simplex viruses type 1 and 2 and *Treponema pallidum*. Their detection is important since these ulcers are a risk factor for the transmission and acquisition of HIV. There are different types of tests for the detection of these pathogens, such as PCR and serology, although real-time PCR has proven to be the most specific and sensitive tool for detecting them.

Treponema pallidum is a bacterium which causes syphilis (venereal and endemic), yaws and pinta. Although only venereal syphilis is sexually transmitted, because it requires close personal contact, due to the poor tolerance of these to desiccation and elevated temperature.

Herpes simplex viruses type 1 and 2 cause genital herpes and persistent infections. They cannot be distinguished clinically; the same treatment is used for infections caused by both viruses. The dose and frequency will be determined by the location of the lesions and the chronicity of the infection. Infection with herpes simplex virus type 1 and 2 occurs through the inoculation of viral particles in susceptible mucosae. Thanks to real-time PCR, they can be detected and differentiated.

Principle of the test

Vitassay qPCR Genital ulcer test is based on the real-time amplification of specific conserved fragments of the *US4* gene for Herpes simplex virus 1, *US6* gene for Herpes simplex virus 2 and 16S rRNA gene for *Treponema pallidum*. After DNA extraction, the presence of the Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2 and *Treponema pallidum* is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR Genital ulcer test is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible reaction inhibition. The amplification of the Herpes simplex virus 1 DNA target sequence is detected through the FAM channel, Herpes simplex virus 2 virus DNA target in ROX channel and *Treponema pallidum* DNA in Cy5 channel whereas the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Attached II).

Precautions

- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.

- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or broken or if the foil has been broken or damaged.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. 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.

Procedures

Specimen collection, processing and DNA extraction

For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. The assay has been validated with the following extraction kits:

ZP02012 MagPurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B, using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Genital ulcer Positive Control (red tube) with the 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots in order to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of RNA sample, negative and positive controls and add them into each well.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

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

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (Herpes simplex virus 1), ROX (Herpes simplex virus 2), Cy5 (*Treponema pallidum*) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast or the Stratagene Mx3029P™ check that passive reference option ROX is none. (Attached II)

Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions.

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

Positive control

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for FAM (Herpes simplex virus 1), ROX (Herpes simplex virus 2) and Cy5 (*Treponema pallidum*), which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in FAM, ROX and Cy5 which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. The assay should be repeated.

The result interpretation is summarized in the following table:

Herpes simplex virus 1	Herpes simplex virus 2	<i>Treponema pallidum</i>	Internal Control	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+	+/-	-	+	Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2 and <i>Treponema pallidum</i> Positives
-	-	-	+	-	+	Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2 and <i>Treponema pallidum</i> Negatives
+	-	-	+/-	-	+	Herpes simplex virus 1 Positive, Herpes simplex virus 2 and <i>Treponema pallidum</i> Negatives
+	+	-	+/-	-	+	Herpes simplex virus 1 and Herpes simplex virus 2 Positives, <i>Treponema pallidum</i> Negative
+	-	+	+/-	-	+	Herpes simplex virus 1 and <i>Treponema pallidum</i> Positives, Herpes simplex virus 2 Negative
-	+	-	+/-	-	+	Herpes simplex virus 2 Positive, Herpes simplex virus 1 and <i>Treponema pallidum</i> Negatives
-	+	+	+/-	-	+	Herpes simplex virus 2 and <i>Treponema pallidum</i> Positives, Herpes simplex virus 1 Negative
-	-	+	+/-	-	+	<i>Treponema pallidum</i> Positive, Herpes simplex virus 1 and Herpes simplex virus 2 Negatives
+	+	+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	-	-	Experiment fail

(+) **Positive:** Amplification signal

(-) **Negative:** No amplification signal

If the negative samples not show a positive result for the internal control, they should be retested from the diluted original sample 1:10 or the nucleic acid extraction has to be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

Quality Control

In order to confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

A total of 33 samples in transport medium (belonging to EQA programs) of genital, anal or oropharyngeal pathogens from symptomatic patients were analyzed by Vitassay qPCR Genital ulcer and FTD Genital ulcer (Fast Track Diagnostics). Vitassay qPCR Genital ulcer detected Herpes Simplex Virus 1 in 8 samples, Herpes Simplex Virus 2 in 9 samples and *Treponema pallidum* in 8 samples.

In addition, Vitassay qPCR Genital ulcer was evaluated with the following programmes: QCMD 2017 Central nervous system I EQA pilot study, QCMD 2017 Syphilis EQA programme (SYPH17) and QCMD 2017 enterovirus RNA EQA programme (EVRNA17). The programmes consisted of panels of samples (10 samples, 8 samples and 10 samples, respectively) dissolved in transport medium. These samples were positive or negative to the analyzed pathogens. Vitassay qPCR Genital ulcer detected correctly all the samples from the different panels.

The results show a high sensitivity and specificity to detect Herpes Simplex Virus 1, Herpes Simplex Virus 2 and *Treponema pallidum* using the molecular diagnostic test Vitassay qPCR Genital ulcer.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2 and *Treponema pallidum* templates ranging from 10^7 to 10^1 copies/rxn. This assay has a detection limit of ≥ 10 viral DNA copies per reaction.

Analytical specificity

The analytical specificity for Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2 and *Treponema pallidum* was tested within the panel of following pathogens, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

Cross-reactivity assay		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Escherichia coli</i> 0.1285; O18:H7:K1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Haemophilus ducrey</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Candida dubliniensis</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>Enterobacter cloacae</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	Hepatitis A
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Human Papillomavirus genotypes HP16 and HPV18
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	

Analytical reactivity

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Genital ulcer for Herpes simplex virus 1 was evaluated against HSV 1 MacIntyre strain, showing positive result.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Genital ulcer for Herpes simplex virus 2 was evaluated against HSV 2 MS strain, showing positive result.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Genital ulcer for *Treponema pallidum* was evaluated against *Treponema pallidum* showing positive result.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Genital ulcer has been validated on the following equipments:

- LightCycler Z480, 480II (Roche)
- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

I: For Rotor-Gene® Q and SmartCycler® thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q and/or SmartCycler tubes.

II: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2 and *Treponema pallidum* infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with samples in transport medium, endocervical swabs, urine, plasma, cell lysates and synthetic CSF. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper DNA from clinical specimens 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 may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by the different pathogens, either samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

Attached I: Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Cepheid
SmartCycler®
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Roche
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

High profile Block Thermocyclers
Abbott
Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System
7500 Real-Time PCR System
7900 HT Real-Time PCR System
ABI PRISM 7000
ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Real-Time PCR
Analytik Jena Biometra
TOptical
qTOWER 2.0
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cepheid
SmartCycler®
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Eppendorf
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Stratagene / Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System

* See Attached III to configure exposure settings.

Attached II: Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in the following table:

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

Attached III: Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

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. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Blanco DR, Miller JN, Lovett MA. Surface Antigens of the Syphilis Spirochete and Their Potential as Virulence Determinants. *Emerging Infectious Diseases*. 1997;3(1):11-20.
7. Genital Herpes Simplex Virus (HSV) Module. Genital and Perirectal Herpes Simplex Virus Infection Faculty Notes. CDC. STD Curriculum for Clinical Educators, 2014.

Trademarks

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™ and Mx3029™ 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.

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro diagnostic use only		Almacenar en lugar seco Keep dry
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Fecha de caducidad Use by		Fabricante Manufacturer
	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
DIL	Diluyente de muestra Buffer (sample diluent)		Número de referencia Catalogue number

