

Vitassay qPCR

Vaginosis

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* y/o *Trichomonas vaginalis* en muestras humanas.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* and/or *Trichomonas vaginalis* in human samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR Vaginosis, permite la detección y diferenciación de *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* y/o *Trichomonas vaginalis* mediante PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* y/o *Trichomonas vaginalis*.

Referencias

Vitassay qPCR Vaginosis 4x8-well strip, low profile 7041051

Vitassay qPCR Vaginosis 4x8-well strip, high profile 7042051

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S051/ 7042S051	Vaginosis strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C051	Vaginosis 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

Candida albicans es el hongo patógeno oportunista humano más común. *Candida albicans* puede aislarse del tracto gastrointestinal y de la mucosa oral y vaginal de muchas personas sanas. Aunque varias especies de hongos pertenecientes al género *Candida* pueden causar candidiasis vulvovaginal aguda (CVV), *Candida albicans* es el agente etiológico más prevalente, en particular para la afección crónica más grave conocida como candidiasis vulvovaginal recurrente (CVVR). Aunque la mayoría de los casos de CVV todavía son causados por *Candida albicans*, las especies de *Candida* no *albicans* (NAC) están cada vez más implicadas en la etiología de CVV y las más comunes incluyen *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. africana*, *C. duobushaemulonii* y *C. auris*.

La candidiasis vulvovaginal es una vaginitis comúnmente diagnosticada. Los síntomas son inespecíficos e incluyen flujo vaginal, dolor, irritación, ardor y dispareunia. Además de la morbilidad asociada con la CVV, la colonización por *C. albicans* se ha asociado con una mayor adquisición del VIH en estudios longitudinales. La candidiasis vulvovaginal es relativamente común; el 75% de las mujeres experimentan al menos un episodio de CVV en su vida y el 5% desarrolla candidiasis CVVR. Aunque las especies de *Candida* no se consideran patógenos clásicos de transmisión sexual, existe alguna evidencia de que este organismo puede transmitirse tanto por coito oral como vaginal.

Gardnerella vaginalis está implicada como uno de los agentes causantes de la vaginosis bacteriana (VB), pero también puede aislarse de la vagina de mujeres sanas. Una explicación es que ciertas cepas de *G. vaginalis* son más patógenas que otras. Los avances recientes en la investigación de la patogénesis de la VB han determinado la existencia de 13 especies diferentes dentro del género *Gardnerella*. La vaginosis bacteriana es una disbiosis vaginal y está relacionada con una variedad de bacterias anaeróbicas patógenas heterogéneas que resultan en la disminución del número de especies sanas de *Lactobacillus*.

Los datos epidemiológicos sugieren fuertemente que la VB es una infección de transmisión sexual (ITS) con un período de incubación de alrededor de 4 días. La infección es más común en mujeres de 15 a 44 años. Aproximadamente del 50% al 75% de las mujeres con VB son asintomáticas. Cuando los síntomas están presentes, los síntomas más comunes incluyen un flujo vaginal blanquecino, delgado y homogéneo y / o un olor vaginal desagradable o "olor a pescado" que es particularmente perceptible después de las relaciones sexuales y alrededor del momento de la menstruación. La tasa de prevalencia de VB es de aproximadamente 21,2 millones (29,2%) en todo el mundo y la tasa de prevalencia de VB es más alta en los países africanos en paralelo a la población de Asia y Europa.

La enfermedad de la vaginosis bacteriana está relacionada con una cantidad apremiante de complicaciones obstétricas y ginecológicas que incluyen aborto

espontáneo, parto prematuro, enfermedad inflamatoria pélvica subclínica, infecciones de heridas posteriores al parto por cesárea, corioamnionitis, ruptura prematura de membranas, endometritis posparto e infecciones posquirúrgicas. Además, la vaginosis bacteriana se asocia con un mayor riesgo de contraer infecciones de transmisión sexual, incluido el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Trichomonas vaginalis es un parásito protozoario flagelado del tracto genital humano que causa la tricomoniasis, la infección de transmisión sexual no viral más prevalente en todo el mundo. El género protista *Trichomonas* contiene este patógeno humano endémico de distribución mundial llamado *Trichomonas vaginalis*. El parásito reside en el tracto genital inferior femenino y en la uretra y la próstata masculinas. La transmisión ocurre casi exclusivamente por contacto sexual.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) calculó que 248 millones de personas estaban infectadas con *T. vaginalis* en 2005, y en 2008 esta cifra había aumentado en un 11,8% a 276,4 millones. La prevalencia e incidencia de la infección vaginal por *T. vaginalis* son más altas en las regiones africanas y en las Américas que en otras partes del mundo. La prevalencia de la infección por *T. vaginalis* en los hombres se calculó como una décima parte de la prevalencia en las mujeres.

En mujeres la enfermedad puede variar de asintomática (hasta el 50% de las mujeres) a grave con secuelas graves. Las mujeres infectadas con *T. vaginalis* tienen un alto riesgo de vaginitis, endometritis, enfermedad inflamatoria pélvica atípica y resultados adversos del embarazo. Este parásito también puede tener consecuencias graves, como infertilidad, rotura prematura de las membranas placentarias, parto prematuro, recién nacidos con bajo peso al nacer y muerte neonatal. Los síntomas clásicos incluyen una secreción maloliente y purulenta que produce dolor e irritación local. Los hombres a menudo son portadores asintomáticos de *T. vaginalis*, aunque también se han informado disuria y secreción y *T. vaginalis* aumenta el riesgo de infertilidad y cáncer de próstata en los hombres. Además, la infección por *T. vaginalis* se ha relacionado con un mayor riesgo y transmisión del VIH tanto para hombres como para mujeres.

Principio del test

Vitassay qPCR Vaginosis se basa en la amplificación a tiempo real de un fragmento de una región conservada de los genes *T. vaginalis-specific 2-kb repeated sequence* para *Trichomonas vaginalis*, 5.8S rRNA para *Candida albicans* y el gen 16S rRNA para *Gardnerella vaginalis*. Tras la extracción de DNA, la presencia de *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* y *Trichomonas vaginalis* se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

Vitassay qPCR Vaginosis, 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 (*Trichomonas vaginalis*), ROX (*Candida albicans*) y Cy5 (*Gardnerella vaginalis*) 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:

ZP02014 Mag Purix Plant DNA Extraction Kit, con MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex)

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Vaginosis 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 (*Trichomonas vaginalis*), ROX (*Candida albicans*), Cy5 (*Gardnerella vaginalis*) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast y Stratagene Mx3005P™ Real-Time PCR System 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 *Trichomonas vaginalis* (FAM), *Candida albicans* (ROX) y *Gardnerella vaginalis* (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:

<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	<i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Gardnerella vaginalis</i> Positivos
-	-	-	+	-	+	<i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Gardnerella vaginalis</i> Negativos
+	-	-	+/-	-	+	<i>Trichomonas vaginalis</i> Positivo, <i>Candida albicans</i> y <i>Gardnerella vaginalis</i> Negativos
+	+	-	+/-	-	+	<i>Trichomonas vaginalis</i> y <i>Candida albicans</i> Positivos, y <i>Gardnerella vaginalis</i> Negativo
+	-	+	+/-	-	+	<i>Trichomonas vaginalis</i> y <i>Gardnerella vaginalis</i> Positivos, y <i>Candida albicans</i> Negativo
-	+	-	+/-	-	+	<i>Candida albicans</i> Positivo, <i>Trichomonas vaginalis</i> y <i>Gardnerella vaginalis</i> Negativos
-	+	+	+/-	-	+	<i>Candida albicans</i> y <i>Gardnerella vaginalis</i> Positivos, <i>Trichomonas</i> <i>vaginalis</i> Negativo
-	-	+	+/-	-	+	<i>Gardnerella vaginalis</i> Positivo, <i>Trichomonas</i> <i>vaginalis</i> y <i>Candida albicans</i> 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.

Un resultado positivo para *C. albicans* y/o *G. vaginalis* no necesariamente indica candidiasis vulvovaginal o vaginosis bacteriana (respectivamente), ya que esos microorganismos pueden formar parte de la microbiota vaginal en mujeres sanas. Los resultados deben ser evaluados por un profesional junto con los datos clínicos del paciente y los resultados de otras pruebas de laboratorio.

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

Vitassay qPCR Vaginosis se evaluó con los siguientes programas EQA: QCMD 2017 *Candida* spp. EQA Programme y QCMD 2017 Immunocompromised EQA Pilot Study para *Candida albicans* y QCMD 2017 Sexually Transmitted Infections I EQA Pilot Study y QCMD 2018 *Trichomonas vaginalis* EQA Pilot Study para *Gardnerella vaginalis* y *Trichomonas vaginalis*.

Las muestras de estos programas eran positivas o negativas a los patógenos de estudio. Vitassay qPCR Vaginosis detectó correctamente todas las muestras de los programas (7 muestras positivas para *Candida albicans*, 2 muestras positivas para *Gardnerella vaginalis* y 9 muestras positivas para *Trichomonas vaginalis*). Las muestras negativas se informaron como negativas. Los resultados se compararon con los informes correspondientes.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* y *Trichomonas vaginalis* utilizando el test de diagnóstico molecular Vitassay qPCR Vaginosis.

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 por reacción.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* y *Trichomonas vaginalis* 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>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i> 0.1285; O18:H7:K1	Papillomavirus Humano genotipos HPV16 y HPV18
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	HSV-1 y HSV-2
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Haemophilus ducrey</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Listeria Innocua</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV)	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> (SW)	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Hepatitis A
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	Cytomegalovirus
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Enterococcus faecium</i>		

Reactividad analítica

Vitassay qPCR Vaginosis ha sido evaluado para *Candida albicans* frente a *Candida albicans*, obteniéndose un resultado positivo.

Vitassay qPCR Vaginosis ha sido evaluado para *Gardnerella vaginalis* frente a *Gardnerella vaginalis* obteniéndose un resultado positivo.

Vitassay qPCR Vaginosis ha sido evaluado para *Trichomonas vaginalis* frente a *Trichomonas vaginalis* mostrando un resultado positivo.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Vaginosis, ha sido probado en los siguientes equipos:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (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

- 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 con DNA extraído de frotis endocervical, vaginal y vagino-rectal, orina, plasma, lavado broncoalveolar (BAL), esputo, salino y muestras en medio de transporte. 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™ 2 Real-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	
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	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 Vaginosis allows the detection and differentiation of *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis* by real-time PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis* infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR Vaginosis 4x8-well strip, low profile 7041051

Vitassay qPCR Vaginosis 4x8-well strip, high profile 7042051

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S051/ 7042S051	Vaginosis strips low/high profile	-	4x8-well strip
7C051	Vaginosis 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

Candida albicans is the most common human opportunistic fungal pathogen. *Candida albicans* can be isolated from the gastrointestinal tract, and oral and vaginal mucosa of many healthy individuals. Although, a number of fungal species belonging to the genus *Candida* can cause acute vulvovaginal candidiasis (VVC), *Candida albicans* is the most prevalent etiological agent, particularly for the most severe chronic condition known as recurrent vulvovaginal candidiasis (RVVC). Although most cases of VVC are still caused by *Candida albicans*, non-*albicans Candida* (NAC) species are increasingly being implicated in the etiology of VVC with the most common including *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. africana*, *C. duobushaemulonii*, and *C. auris*.

Vulvovaginal candidiasis is a commonly diagnosed vaginitis. Symptoms are nonspecific and include vaginal discharge, soreness, irritation, burning, and dyspareunia. In addition to the morbidity associated with VVC, *C. albicans* colonization has been associated with increased HIV acquisition in longitudinal studies. Vulvovaginal candidiasis is relatively common with 75% of women experiencing at least one episode of VVC in their lifetime, and 5% developing RVVC. Although *Candida* species are not regarded as classical sexually transmitted pathogens, there is some evidence that this organism can be transmitted by both oral and vaginal intercourse.

Gardnerella vaginalis is implicated as one of the causative agents of bacterial vaginosis (BV), but it can also be isolated from the vagina of healthy women. One explanation is that certain strains of *G. vaginalis* are more pathogenic than others. Recent advances in BV pathogenesis research have determined the existence of 13 different species within the genus *Gardnerella*. Bacterial vaginosis is a vaginal dysbiosis and is linked with a variety of heterogeneous pathogenic anaerobic bacteria which results in the decrease in number of healthy *Lactobacillus* species.

Epidemiological data strongly suggest that BV is a sexually transmitted infection (STI) with an incubation period of around 4 days. The infection is most common in women of age from 15-44 years. Approximately 50% to 75% of women with BV are asymptomatic. When symptoms are present, the most common presenting symptoms include an off-white, thin, homogenous vaginal discharge and/or an unpleasant vaginal odor or "fishy smell" that is particularly noticeable after sexual intercourse and around the time of menstruation. The prevalence rate of BV is about 21.2 million (29.2%) worldwide and BV prevalence rate is higher in African countries in parallel to Asia and Europe population.

BV disease is linked with a compelling amount of obstetric and gynecological complications which includes spontaneous abortion, preterm delivery, subclinical pelvic inflammatory disease, post-Caesarean delivery wound infections, chorioamnionitis, premature rupture of membranes, postpartum endometritis, and postsurgical infections.

Moreover, bacterial vaginosis is associated with an increased risk of acquisition of sexually transmitted infections including human immunodeficiency virus (HIV).

Trichomonas vaginalis is a flagellated protozoan parasite of the human genital tract which causes Trichomoniasis, the most prevalent non-viral sexually transmitted infection worldwide. The protist genus *Trichomonas* contains this globally distributed endemic human pathogen called *Trichomonas vaginalis*. The parasite resides in the female lower genital tract and the male urethra and prostate. Transmission occurs almost exclusively via sexual contact.

The World Health Organization (WHO) estimated that 248 million people were infected with *T. vaginalis* in 2005, and by 2008 this number had increased by 11.8% to 276.4 million. The prevalence and incidence of vaginal *T. vaginalis* infection are higher in African regions and in the Americas than in other parts of the world. The prevalence of *T. vaginalis* infection for men it was calculated as one tenth of the prevalence in women.

In women, the disease may range from asymptomatic (up to 50% of women) to severe with serious sequelae. Women infected with *T. vaginalis* are at high risk of vaginitis, endometritis, atypical pelvic inflammatory disease, and adverse pregnancy outcomes. This parasite can also result in serious consequences, such as infertility, premature rupture of placental membranes, premature delivery, low-birth-weight infants, and neonatal death. Classical symptoms include a malodorous and purulent discharge which results in local pain and irritation. Men are often asymptomatic carriers of *T. vaginalis*, although dysuria and discharge have also been reported and *T. vaginalis* increases the risk of infertility and prostate cancer in men. Furthermore, *T. vaginalis* infection has been linked with increased risk and transmission of HIV for both men and women.

Principle of the test

Vitassay qPCR Vaginosis test is based on the real-time amplification of *T. vaginalis*-specific 2-kb repeated sequence for *Trichomonas vaginalis*, a conserved region of 5.8S rRNA gene for *Candida albicans* and 16S rRNA gene for *Gardnerella vaginalis*. After DNA extraction, the presence of *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis* is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR Vaginosis 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 *Trichomonas vaginalis* DNA target sequence is detected through the FAM channel, *Candida albicans* DNA target in ROX channel and *Gardnerella vaginalis* 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:

ZP02014 Mag Purix Plant DNA Extraction Kit, using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Vaginosis 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 DNA sample, negative and positive controls and add them to the corresponding wells.
- 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 (*Trichomonas vaginalis*), ROX (*Candida albicans*), Cy5 (*Gardnerella vaginalis*) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast or the Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. (See 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 (*Trichomonas vaginalis*), ROX (*Candida albicans*) and Cy5 (*Gardnerella vaginalis*), 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:

<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	Internal Control	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+	+/-	-	+	<i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Candida albicans</i> and <i>Gardnerella vaginalis</i> Positive
-	-	-	+	-	+	<i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Candida albicans</i> and <i>Gardnerella vaginalis</i> Negative
+	-	-	+/-	-	+	<i>Trichomonas vaginalis</i> Positive, <i>Candida albicans</i> and <i>Gardnerella vaginalis</i> Negative
+	+	-	+/-	-	+	<i>Trichomonas vaginalis</i> and <i>Candida albicans</i> Positive, and <i>Gardnerella vaginalis</i> Negative
+	-	+	+/-	-	+	<i>Trichomonas vaginalis</i> and <i>Gardnerella vaginalis</i> Positive, and <i>Candida</i> <i>albicans</i> Negative
-	+	-	+/-	-	+	<i>Candida albicans</i> Positive, <i>Trichomonas vaginalis</i> and <i>Gardnerella vaginalis</i> Negative
-	+	+	+/-	-	+	<i>Candida albicans</i> and <i>Gardnerella vaginalis</i> Positive, <i>Trichomonas</i> <i>vaginalis</i> Negative
-	-	+	+/-	-	+	<i>Gardnerella vaginalis</i> Positive, <i>Trichomonas</i> <i>vaginalis</i> and <i>Candida</i> <i>albicans</i> Negative
-	-	-	-	-	+	Experiment fail
+	+	+	+	+	-	Experiment fail

(+) Positive: Amplification signal

(-) Negative: No amplification signal

If the negative samples do 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.

A positive test result for *C. albicans* and/or *G. vaginalis* does not necessarily indicate vulvovaginal candidiasis or bacterial vaginosis (respectively), since those microorganisms can be part of the vaginal microbiota in healthy women. The results should be evaluated by a professional alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

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

Vitassay qPCR Vaginosis was evaluated with the following EQA programmes: QCMD 2017 *Candida* spp. EQA Programme and QCMD 2017 Immunocompromised EQA Pilot Study for *Candida albicans* and QCMD 2017 Sexually Transmitted Infections I EQA Pilot Study and QCMD 2018 *Trichomonas vaginalis* EQA Pilot Study for *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis*.

The samples were positive or negative to the analysed pathogens. Vitassay qPCR Vaginosis detected correctly all the samples (7 *Candida albicans* positive samples, 2 *Gardnerella vaginalis* positive samples and 9 *Trichomonas vaginalis* positive samples). Negative samples were reported as negative. The results were compared with the corresponding reports.

The results show a high sensitivity and specificity to detect *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis* using the molecular diagnostic test Vitassay qPCR Vaginosis.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis* 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 *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis* was tested within the panel of following pathogens, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

Cross-reactivity assay		
<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i> 0.1285; O18:H7:K1	Human papillomavirus genotypes HPV16 and HPV18
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	HSV-1 and HSV-2
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Haemophilus ducrey</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Listeria Innocua</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV)	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> (SW)	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Hepatitis A
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	Cytomegalovirus
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Enterococcus faecium</i>		

Analytical reactivity

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Vaginosis for *Candida albicans* was evaluated against *Candida albicans*, showing positive result.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Vaginosis for *Gardnerella vaginalis* was evaluated against *Gardnerella vaginalis*, showing positive result.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Vaginosis for *Trichomonas vaginalis* was evaluated against *Trichomonas vaginalis* showing positive result.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Vaginosis has been validated on the following equipments:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (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

- All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with DNA extracted from endocervical, vaginal and vagino-rectal smears, urine, plasma, bronchoalveolar lavage (BAL), sputum, saline, and samples in transport medium. 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 template DNA 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. Reiter S, Kellogg Spadt S. (2019). Bacterial vaginosis: a primer for clinicians. *Postgrad Med.* 131(1):8-18.
2. Javed A, Parvaiz F, Manzoor S. (2019). Bacterial vaginosis: An insight into the prevalence, alternative treatments regimen and it's associated resistance patterns. *Microb Pathog.* 127:21-30.
3. Muzny CA, Taylor CM, Swords WE, et al. (2019). An Updated Conceptual Model on the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis. *J Infect Dis.* 220(9):1399-1405.
4. Potter RF, Burnham CD, Dantas G. (2019). In Silico Analysis of Gardnerella Genomespecies Detected in the Setting of Bacterial Vaginosis. *Clin Chem.* 65(11):1375-1387.
5. Peters A, Das S, Raidal SR. (2020). Diverse Trichomonas lineages in Australasian pigeons and doves support a columbid origin for the genus Trichomonas. *Mol Phylogenet Evol.* 143:106674.
6. Noh CS, Kim SS, Park SY, Moon HS, Hong Y, Ryu JS. (2019). Comparison of Two PCR Assays for Trichomonas vaginalis. *Korean J Parasitol.* 57(1):27-31.
7. Bouchemal K, Bories C, Loiseau PM. (2017). Strategies for Prevention and Treatment of Trichomonas vaginalis Infections. *Clin Microbiol Rev.* 30(3):811-825.
8. Edwards T, Burke P, Smalley H, Hobbs G. (2016). Trichomonas vaginalis: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. *Crit Rev Microbiol.* 42(3):406-417.
9. Mielczarek E, Blaszkowska J. (2016). Trichomonas vaginalis: pathogenicity and potential role in human reproductive failure. *Infection.* 44(4):447-458.
10. Šoba B, Skvarč M, Matičič M. (2015). Trichomoniasis: a brief review of diagnostic methods and our experience with real-time PCR for detecting infection. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 24(1):7-10.
11. Brown SE, Schwartz JA, Robinson CK, et al. (2019). The Vaginal Microbiota and Behavioral Factors Associated with Genital Candida albicans Detection in Reproductive-Age Women. *Sex Transm Dis.* 46(11):753-758.

12. Cassone A. (2015). Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG*. 122(6):785-794.
13. Kim J, Sudbery P. (2011). *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol*. 49(2):171-177.
14. Makanjuola O, Bongomin F, Fayemiwo SA. (2018). An Update on the Roles of Non-*albicans* *Candida* Species in Vulvovaginitis. *J Fungi (Basel)*. 4(4):121. Published 2018 Oct 31.

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

