

Vitassay qPCR

NG CiproRes

PCR en tiempo real para la identificación y detección cualitativa del DNA de *N. gonorrhoeae* y/o una mutación específica puntual en *N. gonorrhoeae* (en el gen *gyrA*, cambiando la serina en la posición 91 del genotipo wild type a fenilalanina) que genera resistencia al ciprofloxacino, en muestras clínicas.

Real-time PCR kit for the identification and qualitative detection of DNA from *N. gonorrhoeae* and/or specific point mutation in *N. gonorrhoeae* (in the *gyrA* gene, changing the serine in position 91 of the wild type genotype to phenylalanine) that generates resistance to ciprofloxacin, in clinical samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR NG CiproRes permite la identificación y detección cualitativa de DNA de *N. gonorrhoeae* y/o una mutación específica puntual en *N. gonorrhoeae* (en el gen *gyrA*, cambiando la serina en la posición 91 del genotipo wild type a fenilalanina) que genera resistencia al ciprofloxacino (CIP), en muestras de orina uretral, hisopos uretrales, hisopos rectales e hisopos endocervicales ya caracterizados como positivos a *N. gonorrhoeae* (mediante métodos moleculares) de pacientes con sospecha de padecer gonorrea. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de infección causada por *N. gonorrhoeae* y su posible resistencia o sensibilidad al CIP, junto con los datos clínicos del paciente y los resultados de otras pruebas de laboratorio.

Referencias

Vitassay qPCR NG CiproRes 4x8-well strip, low profile 7041068

Vitassay qPCR NG CiproRes 4x8-well strip, high profile 7042068

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S068/ 7042S068	NG CiproRes strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C068	NG CiproRes 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 alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio (- 30°C a - 10°C y / o ≤ -70°C)
- 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 infecciones de transmisión sexual (ITS) engloban muchos síndromes clínicos e infecciones causadas por patógenos se transmiten a través de la actividad sexual. Las infecciones de transmisión sexual están aumentando en todo el mundo, junto con la resistencia a antibióticos.

Neisseria gonorrhoeae es un diplococo Gram negativo, un patógeno humano obligado que es el agente etiológico de la gonorrea. *N. gonorrhoeae* pertenece al género *Neisseria*, en el que también se incluye *Neisseria meningitidis*, causante de la meningitis bacteriana. *N. gonorrhoeae* coloniza principalmente la mucosa genital, pero también puede colonizar la mucosa ocular, nasofaríngea y anal. En la flora nasal y orofaríngea humana hay al menos ocho especies de *Neisseria* comensales no patógenas. Dado que tanto las *Neisseria* spp. comensales como las patógenas se encuentran en los mismos nichos, a menudo es difícil diferenciar los factores de colonización de los factores de virulencia necesarios para dañar al huésped.

La gonorrea es una infección de transmisión sexual, que sigue siendo un importante problema de salud pública mundial. Esta enfermedad tiene una alta carga de morbilidad, con más de 106 millones de nuevos casos diagnosticados cada año en todo el mundo. La morbilidad aumenta exponencialmente debido a la facilidad de *Neisseria gonorrhoeae* para adquirir resistencia a todos los antimicrobianos introducidos para su tratamiento.

Las complicaciones de las infecciones ascendentes del tracto genital no tratadas en las mujeres pueden incluir la enfermedad inflamatoria pélvica, la infertilidad y el embarazo ectópico. El patógeno no puede sobrevivir fuera del huésped, siendo necesario un contacto sexual para su transmisión. Si la infección se disemina, puede causar artritis y endocarditis y la transmisión materna durante el parto puede provocar ceguera neonatal. Las infecciones genitales femeninas son en su mayoría asintomáticas y las masculinas son en su mayoría sintomáticas, lo cual se basa en que en los hombres es más fácil observar los síntomas como exudado purulento del pene y micción dolorosa, mientras

que en las mujeres la manifestación clínica es menos dolorosa y específica y podría confundirse con vaginosis bacteriana.

Dado que la resistencia a los fármacos parece imparable, son necesarias nuevas opciones de tratamiento para controlar la enfermedad. Existen tres enfoques para el desarrollo de nuevas terapias contra *N. gonorrhoeae* resistente a los fármacos: combinaciones novedosas de antibióticos ya existentes, desarrollo de nuevos antibióticos y desarrollo de terapias alternativas.

El ciprofloxacino es un antibiótico de fluoroquinolona de segunda generación que se utiliza habitualmente para tratar infecciones leves o moderadas del tracto urinario y respiratorio. También se utiliza contra la diarrea infecciosa, la fiebre tifoidea, la gonorrea no complicada, el tratamiento de la portación nasal de *Neisseria meningitidis* y la profilaxis contra el ántrax. Las fluoroquinolonas actúan inhibiendo las enzimas bacterianas ADN girasa y topoisomerasa IV, necesarias para la producción de ARNm (transcripción) y la replicación del ADN. La ventaja es que las células humanas carecen de ADN girasa, y las topoisomerasas humanas no se ven afectadas por la supresión de las fluoroquinolonas.

La resistencia a ciprofloxacino en *N. gonorrhoeae* suele estar causada por mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*, que codifican las topoisomerasas II y IV, respectivamente. La resistencia suele estar determinada por combinaciones simultáneas de alteraciones en ambas proteínas, pero depende de la región geográfica. S91F o T, A92P, D95N o A o G, 197M y Q102H son las sustituciones más comúnmente documentadas en la proteína GyrA de *N. gonorrhoeae*.

Principio del test

Vitassay qPCR NG CiproRes se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada del gen *porA* (*N.gonorrhoeae*), y una mutación puntual específica en el gen *gyrA* (*N. gonorrhoeae*) relacionada con la resistencia a CIP. Tras la extracción de los ácidos nucleicos, la presencia de los patógenos se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrolisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los primers, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5' - 3' produciendo la separación espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

Vitassay qPCR NG CiproRes, se trata de una prueba lista 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. Tras la reacción de amplificación *N. gonorrhoeae* resistente a ciprofloxacino se detecta en el canal FAM, *N. gonorrhoeae* se detecta en el canal ROX, el Control Interno (CI) se detecta en el canal Cy5 y *N. gonorrhoeae* sensible a ciprofloxacino se detecta en HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro* (uso por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado).
- 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 o si el aluminio protector está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- 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. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación nacional sobre residuos sanitarios y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Evite la contaminación con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) o microbiológica de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.

- Use equipos de protección individual (EPI) y cabina de seguridad biológica para el manejo de muestras potencialmente infecciosas y reactivos según recomendaciones actuales.

Procedimiento

Toma, transporte y conservación de muestras

Para la recogida, la conservación y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. Vitassay qPCR NG CiproRes ha sido testado en muestra de orina uretral, hisopos uretrales, hisopos rectales e hisopos endocervicales ya caracterizados como positivos a *N. gonorrhoeae* recogidos en tubos estériles (APTIMA® Urine Specimen Collection Kit – HOLOGIC). El usuario debe validar otros tipos de muestras.

En general, las muestras deben recogerse adecuadamente en recipientes limpios, etiquetarse correctamente y procesarse con prontitud para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. El transporte debe realizarse siempre conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Las muestras deben transportarse a temperatura ambiente como máximo durante 1 hora. Para un transporte de mayor duración (más de 1 hora), se recomienda el envío a -20°C o menos. Las muestras pueden conservarse congeladas a -20°C o menos (-80°C idealmente). Los ciclos de congelación-descongelación deben ser evitados para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con pautas de laboratorio adecuadas. Para más información puede consultar las siguientes guías:

- Miller JM, et al. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. Clin Infect Dis. Aug 31;67(6):e1-e94.
- García-Lechuz Moya JM, et al. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

Extracción de DNA

Para el aislamiento de los ácidos nucleicos a partir de muestras clínicas se puede utilizar un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Realizar el pretratamiento de la muestra siguiendo las instrucciones del kit de extracción utilizado. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- MagDEA Dx SV Kit, utilizando el instrumento magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.)
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex)
- MagCore® Viral Nucleic Acid Extraction Kit, utilizando el equipo MagCore® HF16 Nucleic Acid extractor (RBC Biotech)

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del NG CiproRes 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 para cada uno de los ensayos).
- 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) o 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
Activación de la polimerasa	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	10 seg	45
Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	63°C	50 seg	

Los datos de fluorescencia se deben recoger durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (*N. gonorrhoeae* resistente a ciprofloxacino), ROX (*N. gonorrhoeae*),

Cy5 (Control Interno) y HEX, JOE o VIC (*N. gonorrhoeae* sensible a ciprofloxacino). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de los resultados se realiza con el software propio del equipo de PCR en tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación compruebe la emisión de señal de control interno (CI).

Utilice la curva de amplificación del control positivo como punto de partida durante la validación de la reacción (antes de la interpretación de los resultados de las muestras), para garantizar que el threshold se sitúe dentro de la fase exponencial de las curvas de amplificación y por encima de cualquier señal de ruido de fondo. El valor de threshold puede variar entre distintos instrumentos debido a las diferentes intensidades de señal. Se recomienda establecer los valores de threshold para cada canal (diana) de forma independiente por el usuario final.

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 ($Ct \leq 40$) en los canales FAM, ROX, y HEX, VIC o JOE.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal ($Ct > 40$ o no señal) de FAM, ROX, y HEX, VIC o JOE.

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

El Control Interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación ($Ct \leq 40$) en los pocillos del control positivo y control negativo.

Una vez validado el resultado de los controles, con la ayuda de la siguiente tabla analizar los resultados de las muestras:

NG CiproRes				Interpretación
Resistencia a CIP (FAM)	Sensibilidad a CIP (HEX)	<i>N. gonorrhoeae</i> (ROX)	Control Interno (Cy5)	
-	-	+	+/- ¹	DNA de <i>N. gonorrhoeae</i> detectado ³
+	-	+	+/- ¹	DNA de <i>N. gonorrhoeae</i> resistente a CIP detectado
-	+	+	+/- ¹	DNA de <i>N. gonorrhoeae</i> sensible a CIP detectado
+	+	+	+/- ¹	DNA de <i>N. gonorrhoeae</i> resistente y sensible a CIP detectado
-	-	-	+ ²	DNA molde diana no Detectado
-	-	-	- ²	Test fallido

Positivo (+): Señal de amplificación (Ct ≤40)

Negativo (-): No hay señal de amplificación (Ct >40 o no señal)

¹ 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. El control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal).

² En el caso de que la detección de las regiones diana de los patógenos resulte negativa, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤ 35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct >35 del control interno, el resultado se considera "invalido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100, o repetir la extracción y el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

³ Una concentración baja de *N. gonorrhoeae* (Ct >35) puede impedir la detección del gen de resistencia/sensibilidad al CIP.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de fluorescencia. Se recomienda también repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado, en función del material disponible (obtener un nuevo espécimen y volver a testar, volver a extraer y testar otra alícuota de la misma muestra o, repetir qPCR con la misma muestra de DNA aislada).

Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional de la salud, juntamente con el historial médico, los síntomas clínicos y/o los resultados obtenidos en otras pruebas de diagnóstico.

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

La evaluación del funcionamiento clínico de Vitassay qPCR NG CiproRes se evaluó en un estudio con 124 remanentes de hisopos y primera orina (orina uretral) de pacientes de ambos sexos, con un diagnóstico inicial de infección por *N. gonorrhoeae* mediante métodos rutinarios de laboratorio. Todas las muestras se identificaron inicialmente como *N. gonorrhoeae* y se analizaron con el kit Vitassay qPCR y otro kit molecular y/o de secuenciación para evaluar la resistencia a ciprofloxacino. Vitassay qPCR NG CiproRes reportó 122 muestras verdaderas positivas para *N. gonorrhoeae*, 61 verdaderas positivas para *N. gonorrhoeae* resistente al CIP (mutación puntual detectada en el gen *gyrA*) y 55 verdaderas positivas para *N. gonorrhoeae* sensible al CIP (gen *gyrA* de tipo salvaje). Finalmente se obtuvieron 10 resultados incongruentes con el kit Vitassay: 2 falsos negativos para *N. gonorrhoeae*, 7 falsos negativos para la detección de la mutación *gyrA* y un falso negativo para la detección del gen *gyrA* de tipo salvaje. No se encontraron valores falsos positivos. Se realizó un análisis estadístico para obtener los valores de sensibilidad y especificidad indicados a continuación (IC=95%):

Diana	TP	TN	FP	FN	SE	SP
<i>N. gonorrhoeae</i>	122	0	0	2	0.98(0.94-0.99)	NA
Point mutation <i>gyrA</i> gene	61	56	0	7	0.89 (0.79-0.95)	1 (0.93-1)
WT <i>gyrA</i> gene	55	68	0	1	0.98 (0.90-1)	1 (0.94-1)

TP: verdadero positivo; TN: verdadero negativo; FP: falso positivo; FN: falso negativo; SE: sensibilidad; SP: especificidad.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de estándares de los diferentes patógenos (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de 4 copias de DNA por reacción para el gen de resistencia a ciprofloxacino de *N. gonorrhoeae*, 0.02 CFU por reacción para *N. gonorrhoeae*, y 1.28

CFU por reacción para el gen de sensibilidad a ciprofloxacino de *N. gonorrhoeae* (tasa de positividad $\geq 95\%$), en muestras clínicas de hisopos vaginales.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de *Neisseria gonorrhoeae* fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas con ninguna de las especies:

Pruebas de reactividad cruzada					
<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-
<i>Mycoplasma hominis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> serotipo 11	-	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Escherichia coli</i> cepa 0.1285; O18:H7:K1	-	<i>Neisseria cinerea</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo A	-
<i>Candida dubliniensis</i>	-	<i>Haemophilus ducreyi</i> cepa Clase 1	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> cepa Minn A	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Candida krusei</i> (<i>Issatchenkia orientalis</i>)	-	Virus Hepatitis A	-	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	Herpes Simplex Virus 1 cepa MacIntyre	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	Herpes Simplex Virus 2 cepa MS	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> cepa SW	-	Papillomavirus Humano tipos 16 y 18	-	<i>Streptococcus agalactiae</i> cepa Z019	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> genovar F	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa Z022	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> serovar E, I y K	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> serotipo Capsular 2	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> cepa LGV	-	<i>Listeria innocua</i> serotipo 6a	-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-
Citomegalovirus cepa AD-169	-	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> serovar 5	-	<i>Ureaplasma parvum</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> serotipo Cloaca B	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 4b	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
<i>Enterobacter cloacae</i> serotipo Cloaca A	-				

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR NG CiproRes para *N. gonorrhoeae* sensible a ciprofloxacino se evaluó frente a DNA extraído de *Neisseria gonorrhoeae* cepa NCTC 8375 [B 5025], *Neisseria gonorrhoeae* cepa 49226 and *Neisseria gonorrhoeae* cepa Lvl Ng PorA como referencia, mostrando resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR NG CiproRes para *N. gonorrhoeae* resistente a ciprofloxacino se evaluó frente a DNA extraído de muestras clínicas positivas a *N. gonorrhoeae* resistente a ciprofloxacino como referencia, mostrando resultados positivos.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR NG CiproRes ha sido validado en los siguientes equipos:

- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^I
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX Opus 96 Touch™ 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) ^{II}
- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- MIC qPCR Cycler (Bio Molecular Systems) ^{II}
- NEOS-96 Real Time PCR System (Linear)

^I: 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).

^{II}: Para los equipos Rotor-Gene® Q y MIC qPCR Cycler el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de cada equipo.

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 validado con DNA extraído de muestras de orina uretral, hisopos uretrales, hisopos rectales e hisopos endocervicales previamente caracterizados como positivas para *N. gonorrhoeae* (mediante un método molecular). 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.

- Esta prueba no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. Esta prueba es un ensayo cualitativo.
- 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 resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada, ya sea por el NG CiproRes positivo control durante su reconstitución, por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- La detección puede verse afectada por varios factores y sus combinaciones que pueden conducir a resultados falsos negativos, que incluyen: a) inadecuado muestreo, envío, almacenamiento y manipulación de las muestras; b) errores de procedimiento (incluido el aislamiento de DNA); c) Degradación del DNA durante el envío, almacenamiento y/o preparación de muestras; d) mutaciones potenciales de las secuencias diana de *Neisseria gonorrhoeae* resistente o sensible a CIP identificadas por este test que pueden provocar que el DNA sea indetectable e) la carga de este patógeno esté por debajo del límite de detección del ensayo; f) presencia de inhibidores de la amplificación en tiempo real u otros tipos de interferencia (no se realizó un estudio de interferencia que evaluara el efecto de vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma); g) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante.
- La detección del DNA puede no indicar la presencia de bacterias viables y/o infecciosas o sea estas bacterias sean el agente causante de los síntomas clínicos.
- Resultados negativos no impiden la infección por *N. gonorrhoeae* resistente o sensible a CIP y no deben ser la única base de una decisión de tratamiento/manejo del paciente. Aún no se han establecido los tipos de muestras óptimos y/o la etapa de infección más adecuados para su recolección. Considere la recolección de múltiples muestras del mismo paciente en diferentes momentos, lo que puede aumentar la probabilidad de detectar las bacterias.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como el equipo de PCR, el sistema de extracción, el tipo de muestra y su tratamiento previo, entre otros.
- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con *N. gonorrhoeae* resistente o sensible a CIP, y se han descartado otras enfermedades de transmisión sexual, la posibilidad de un resultado falso negativo no se debería descartar y se deberían realizar pruebas adicionales.

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
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}
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™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Azure Biosystems
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾
Azure Cielo 6
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Roche
LightCycler® 480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}
LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}

Formatos especiales ⁽⁷⁾
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cycler
Cepheid
SmartCycler®
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
Qiagen
Rotor-Gene® Q

Termocicladores con bloque de alto perfil
Abbott
Abbott m2000 ⁽¹⁾
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena
qTOWER
BIONEER
Exicycler™ 96
BIOER
QuantGene 9600
Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽⁸⁾
Eppendorf
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen
QIAquant 96

- (1) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos de PCR a tiempo real.
- (2) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
- (3) No lectura en canal ROX.
- (4) No lectura en canal Cy5.
- (5) Lectura solo en canales FAM y HEX.
- (6) Se requiere compensación de color específica.
- (7) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento de la prueba) y transvasar a los tubos específicos Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q o geneLEAD VIII System.
- (8) Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición.

Adjunto II. 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 siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480 II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	Introducir los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico (Menú "Run Profile"). Seleccionar "Acquire on" para todos los canales (haciendo click sobre ellos en ventana "Cycling"). Utilice los valores del "Gain" por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	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	
BIONEER Exicycler™ 96	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
DTIite 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

* En el caso de un resultado no esperado, sin amplificaciones o con un elevado ruido de fondo en el canal FAM, por favor, reduzca los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

Intended use

Vitassay qPCR NG CiproRes allows the identification and qualitative detection of DNA from *N. gonorrhoeae* and/or a specific point mutation in *N. gonorrhoeae* (in the *gyrA* gene, changing the serine in position 91 of the wild type genotype to phenylalanine) that generates resistance to ciprofloxacin (CIP), from urethral urine, urethral swabs, endocervical swabs and rectal swabs samples already characterized as *N. gonorrhoeae* positive (using molecular assays) of patients suspected of gonorrhea disease. This product is intended to aid in the diagnosis of infections caused by *N. gonorrhoeae* and its possible resistance or sensitivity to CIP, alongside the patient's clinical data and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR NG CiproRes 4x8-well strip, low profile	7041068
Vitassay qPCR NG CiproRes 4x8-well strip, high profile	7042068

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S068/ 7042S068	NG CiproRes strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C068	NG CiproRes 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	-	4 x 8-cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated on the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. 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

- Collection and transport system.
- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C).
- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortex
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Sexually Transmitted Infections (STIs) embrace many clinical syndromes and infections caused by pathogens that can be acquired and transmitted through sexual activity. There is an increase in all STIs worldwide, and antibiotic resistance is also on the rise.

Neisseria gonorrhoeae is a Gram-negative diplococcus, an obligate human pathogen which is the etiological agent of gonorrhoea. *N. gonorrhoeae* belongs to the genus *Neisseria*, in which is also included *Neisseria meningitidis*, which causes bacterial meningitis. *N. gonorrhoeae* mainly colonizes the genital mucosa, but it can also colonize the ocular, nasopharyngeal and anal mucosa. There are at least eight non-pathogenic commensal *Neisseria* spp. located in the human nasal and oropharyngeal flora. As both the commensal and pathogenic *Neisseria* spp. are in the same niches, it is often difficult to differentiate colonization factors from the virulence factors that are necessary to elicit host damage.

The gonorrhoea is a sexually transmitted infection, which remains a major global public health concern. This disease has a high morbidity burden, with more than 106 million new cases being diagnosed every year worldwide. The morbidity is increasing exponentially due to *Neisseria gonorrhoeae* facility to acquire resistance to all antimicrobials introduced for its treatment.

Complications from untreated, ascending, genital-tract infections in women can include pelvic inflammatory disease, infertility, and ectopic pregnancy. The pathogen cannot survive outside the host, so its transmission requires a sexual contact. If the infection is disseminated, can cause arthritis and endocarditis. Also, maternal transmission can lead to neonatal blindness. Female genital infections are mostly asymptomatic and male genital infection are mostly symptomatic, which is based on the fact that in men is easier to observe the symptoms such as purulent exudate from the penis and painful urination, whereas in women the clinical manifestation is less painful and specific and could be mistaken for bacterial vaginosis.

Seeing as drug resistance appears to be unstoppable, new treatment options are necessary to control the disease. There are three approaches for the development of new therapies against drug-resistant *N. gonorrhoeae*: novel combinations of already existing antibiotics, development of new antibiotics and development of alternative therapies.

Ciprofloxacin is a second-generation fluoroquinolone antibiotic that is commonly used to treat mild to moderate urinary and respiratory tract infections. It is also used against infectious diarrhea, typhoid fever, uncomplicated gonorrhea, treatment of *Neisseria meningitidis* nasal carriage and prophylaxis against anthrax. The fluoroquinolones work by inhibiting the bacterial enzymes DNA gyrase and topoisomerase IV, which are needed for mRNA production (transcription) and DNA replication. The advantage is that human cells lack DNA gyrases, and human topoisomerases are not affected by fluoroquinolone suppression.

Ciprofloxacin resistance in *N. gonorrhoeae* is usually caused by mutations in the *gyrA* and *parC* genes, which code for topoisomerases II and IV, respectively. Resistance is normally determined by simultaneous combinations of alterations in both proteins, but it depends on geographical region. S91F or T, A92P, D95N or A or G, 197M and Q102H are the most commonly documented substitutions in the *N. gonorrhoeae* GyrA protein.

Principle of the test

Vitassay qPCR NG CiproRes is based on the real-time amplification of a conserved region of *porA* gene (*N. gonorrhoeae*) and a specific point mutation in the *gyrA* gene (*N. gonorrhoeae*) that generates resistance to ciprofloxacin (CIP). After nucleic acids isolation, the pathogens presence is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction, after hydrolysis of the fluorescent probe.

The assay is based on 5' exonuclease activity using two primers and a fluorogenic hydrolysis probe to detect accumulation of the amplified target sequence during the PCR reaction. When the polymerase begins to spread the primers, the probe is hydrolyzed by its exonuclease 5'-3' activity causing the spatial separation of the fluorophore and the quencher. The increase in the resulting fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by means of real-time PCR equipment.

Vitassay qPCR NG CiproRes 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 inhibition reaction. After the amplification reaction, *N. gonorrhoeae ciprofloxacin resistant* is detected in FAM channel, *N. gonorrhoeae* is detected in ROX channel, the Internal Control (IC) is detected in Cy5 channel, and the *N. gonorrhoeae* ciprofloxacin sensitive is detected in HEX, VIC, or JOE channels (depending on the equipment used).

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use (use by qualified and trained clinical laboratory personnel).
- 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 is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- 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. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the tube bottom, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the test functionality.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile disposable aerosol resistant pipette tips or RNase/DNase positive displacement pipette tips is recommended.
- Use personal protective equipment (PPE) and biological safety cabinet for handling of potentially infectious samples and reagents according to current recommendations.

Procedures

Specimen collection, transport, and conservation

For specimen collection, conservation, and transport, user-validated conditions must be followed. The Vitassay qPCR NG CiproRes has been tested in urethral urine, endocervical swabs, urethral swabs, and rectal swabs already characterized as positive for *N. gonorrhoeae* and collected in sterile tubes (APTIMA® Urine Specimen Collection Kit – HOLOGIC). Other sample types should be validated by the user.

Overall, clinical samples should be collected appropriately in clean containers, correctly labelled and promptly processed to ensure the test's quality. It is recommended to use fresh specimens for the test. Transport must always be carried out in accordance with local and national regulations for the transport of biological samples. The specimens should be transported at room temperature for up to 1 hour. For long term transport (more than 1 hour), we recommend shipping at -20°C or lower. The samples can be stored frozen at -20°C or lower (at -80°C ideally). Repeated freeze-thaw cycles should be avoided to prevent sample and nucleic acids degradation.

The clinical specimens must be collected, transported, and stored according to appropriate laboratory guidelines. For more information, refer to the following guidelines:

- Miller JM, et al. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. Clin Infect Dis. Aug 31;67(6):e1-e94.
- García-Lechuz Moya JM, et al. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

DNA extraction

For nucleic acid isolation from clinical samples, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. For the sample's pretreatment follow the instructions for use of the extraction kit used. The assay has been validated with the following extraction kits:

- MagDEA Dx SV Kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.)
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex)
- MagCore® Viral Nucleic Acid Extraction Kit, using the MagCore® HF16 Nucleic Acid extractor (RBC Biotech)

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized NG CiproRes Positive Control (red tube) with 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots 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 for each assay.
- 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 (yellow tube) or positive (red tube) controls and add them into 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
Polymerase activation	95°C	2 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	45
Annealing/Extension (Data collection*)	63°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (*N. gonorrhoeae* ciprofloxacin resistant), ROX (*N. gonorrhoeae*), HEX, JOE, or VIC (*N. gonorrhoeae* ciprofloxacin sensitive), and Cy5 (Internal Control) channels. Depending on the equipment used select the proper detection channel (Attached II).

Analysis and interpretation of results

The results analysis is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions. To verify the correct operation of the amplification mix, check the internal control (IC) signal emission.

Use the positive control amplification curve as a starting point during reaction validation (prior to interpretation of sample results), to ensure that the threshold falls within the exponential phase of the amplification curves and above any background noise signals. The threshold value may vary between different instruments due to different signal intensities. It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end user.

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

Positive control

The positive control used in each run must show an amplification curve ($Ct \leq 40$) in FAM, ROX, and HEX, VIC, or JOE channels, which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run must show signal' absence ($Ct > 40$ or no signal) in FAM, ROX, and HEX, VIC, or JOE, which validates the reaction.

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

The Internal Control (IC) should show an amplification signal ($Ct \leq 40$) in positive control and negative control wells.

The clinical samples test results assessment should be performed once controls' results have been validated. The result interpretation is summarized in the following table:

NG CiproRes				Interpretation
CIP resistance (FAM)	CIP sensitivity (HEX)	<i>N. gonorrhoeae</i> (ROX)	Internal Control (Cy5)	
-	-	+	+/- ¹	<i>N. gonorrhoeae</i> DNA detected ³
+	-	+	+/- ¹	<i>N. gonorrhoeae</i> CIP resistant DNA detected
-	+	+	+/- ¹	<i>N. gonorrhoeae</i> CIP sensitive DNA detected
+	+	+	+/- ¹	<i>N. gonorrhoeae</i> CIP resistant and CIP sensitive DNA detected
-	-	-	+ ²	Targets not detected ²
-	-	-	- ²	Test failure ²

(+) Positive: Amplification signal (Ct ≤40)

(-) Negative: No amplification signal (Ct >40 or no signal)

¹ Sometimes, the Internal Control (IC) detection is not necessary since a high copies number of the target can cause a preferential amplification of target-specific nucleic acids. The Internal Control (IC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal).

² In the case of negative pathogens target genes detection, IC must show an amplification signal with Ct ≤ 35. If there is a signal' absence or Ct value >35 of Internal Control, the result is considered 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR by diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or to re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition problems.

³ Low concentration of *N. gonorrhoeae* (Ct>35) may prevent detection of CIP resistance/sensitivity gene.

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to verify the correct performance of each qPCR steps, to review all the parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence intensity. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate, depending on the available material (repeat qPCR with the same isolated DNA sample, or re-extract and retest another aliquot of the same specimen or, obtain a new specimen and retest).

The test results must be evaluated by a health professional, together with the medical history, clinical symptoms and/or the results obtained in other diagnostic tests.

Quality Control

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

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

The Vitassay qPCR NG CiproRes clinical performance was assessed in a study with 124 leftovers of swabs and first urine (urethral urine) from patients of both sexes with an initial diagnosis of *N. gonorrhoeae* infection using laboratory routine methods. All samples were initially identified as *N. gonorrhoeae* and they were analysed with Vitassay qPCR kit and another molecular kit and/or sequencing to assess the ciprofloxacin resistance. Vitassay qPCR NG CiproRes reported 122 samples true positives for *N. gonorrhoeae*, 61 true positives for *N. gonorrhoeae* CIP resistant (point mutation detected in *gyrA* gene) and 55 true positives for *N. gonorrhoeae* CIP sensitive (wild type *gyrA* gene). Finally, 10 incongruent results were obtained with Vitassay kit: 2 false negatives for *N. gonorrhoeae*, 7 false negatives for the detection of *gyrA* mutation and one false negative for wild type *gyrA* gene detection. No false positive values were found. Statistical analysis was performed to obtain the sensitivity and specificity values indicated below (CI=95%):

Target	TP	TN	FP	FN	SE	SP
<i>N. gonorrhoeae</i>	122	0	0	2	0.98(0.94-0.99)	NA
<i>Point mutation gyrA gene</i>	61	56	0	7	0.89 (0.79-0.95)	1 (0.93-1)
WT <i>gyrA</i> gene	55	68	0	1	0.98 (0.90-1)	1 (0.94-1)

TP: true positive; TN: true negative; FP: false positive; FN: false negative; SE: sensitivity; SP: specificity.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of standards from the pathogens ranging from 10^7 to 10^1 copies/reaction. This assay has a detection limit of 4 DNA copies per reaction for *N. gonorrhoeae* ciprofloxacin resistance coding gene, 0.02 CFU per reaction for *N. gonorrhoeae*, and 1.28 CFU per reaction for *N. gonorrhoeae* ciprofloxacin sensitivity coding gene (positive rate $\geq 95\%$), on vaginal swab clinical samples.

Analytical specificity

The analytical specificity for *Neisseria gonorrhoeae* detection was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was observed with any of the species:

Cross-reactivity testing					
<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-
<i>Mycoplasma hominis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> serotype 11	-	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Escherichia coli</i> strain 0.1285; O18:H7:K1	-	<i>Neisseria cinerea</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A	-
<i>Candida dubliniensis</i>	-	<i>Haemophilus ducreyi</i> strain Class 1	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> strain Minn A	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Candida krusei</i> (<i>Issatchenkia orientalis</i>)	-	Hepatitis A Virus	-	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	Herpes Simplex Virus 1 strain MacIntyre	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	Herpes Simplex Virus 2 strain MS	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> strain SW	-	Human Papillomavirus types 16 and 18	-	<i>Streptococcus agalactiae</i> strain Z019	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> genovar F	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain Z022	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> serovar E, I and K	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> serotype Capsular 2	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> strain LGV	-	<i>Listeria innocua</i> serotype 6a	-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-
Cytomegalovirus strain AD-169	-	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> serovar 5	-	<i>Ureaplasma parvum</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> serotype Cloaca B	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 4b	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
<i>Enterobacter cloacae</i> serotype Cloaca A	-				

Analytical reactivity

The Vitassay qPCR NG CiproRes kit's reactivity for *N. gonorrhoeae* ciprofloxacin sensitive was evaluated against DNA extracted from *Neisseria gonorrhoeae* strain NCTC 8375 [B 5025], *Neisseria gonorrhoeae* strain 49226 and *Neisseria gonorrhoeae* strain Lvl Ng PorA as templates, showing positive results.

The Vitassay qPCR NG CiproRes kit's reactivity for *N. gonorrhoeae* ciprofloxacin resistant was evaluated against DNA extracted from clinical samples positive for *N. gonorrhoeae* ciprofloxacin resistant as templates, showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR NG CiproRes has been validated on the following equipment:

- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^I
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen) ^{II}
- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- MIC qPCR Cycler (Bio Molecular Systems) ^{II}
- NEOS-96 Real Time PCR System (Linear)

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

^{II}: For Rotor-Gene® Q and MIC qPCR Cycler the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific tubes of each equipment.

Limitations

- All obtained results must be interpreted by a specialist in conjunction with available clinical information and laboratory findings.
- This assay has been validated with DNA extracted from urethral urine, urethral swabs, endocervical swabs and rectal swab samples already characterized as *N. gonorrhoeae* positive (using molecular assays). The use of other samples has not been established.
- The correct test performance depends on the sample's quality; proper DNA from clinical specimens must be extracted.

- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. This test is a qualitative assay.
- 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 either by NG CiproRes Positive Control during its reconstitution, by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- Detection may be affected by several factors and their combinations which may lead to false negative results, including a) inadequate specimen sampling, shipping, storage, handling; b) procedural errors (including DNA isolation); c) DNA degradation during specimen shipping, storage, and/or preparation; d) potential mutations of the target regions of the *Neisseria gonorrhoeae* CIP resistant or sensitive covered by this test which may result in DNA being undetectable e) pathogen load below the limit of detection for the assay; f) the presence of Real-Time amplification inhibitors or other types of interference (an interference study evaluating the effect of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics, or immunosuppressant drugs used to prevent the infection or used during the treatment of the infection was not performed); g) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures.
- Detection of DNA may not indicate the presence of viable and/or infectious bacteria or that *Neisseria gonorrhoeae* CIP resistant or sensitive is the causative agent for clinical symptoms.
- Negative results do not preclude *Neisseria gonorrhoeae* infection and should not be the sole basis of a patient treatment/management decision. Optimal specimen types and/or stage of infection most suitable for its collection have not been established yet. Consider the collection of multiple specimens from the same patient at different time points, which may increase the probability of detecting the bacteria.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as PCR equipment, extraction system, sample type and its previous treatment, among others.
- If the patient clinical data, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible *N. gonorrhoeae* CIP resistant or sensitive infection, and other sexually transmitted diseases have been discarded, a false negative result might not be discarded, and additional tests should be performed.

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	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 ⁽¹⁾
AriaDx Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Azure Biosystems	Agilent Technologies
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾	Mx3000P™ Real Time PCR System
Azure Cielo 6	Mx3005P™ Real Time PCR System
BIONEER	Analytik Jena
Exicycler™ 96	qTOWER
Bio-Rad	BIONEER
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Exicycler™ 96
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾	BIOER
Roche	QuantGene 9600
LightCycler @480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}	Bio-Rad
LightCycler @96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}	iCycler iQ™ Real-Time PCR
	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
	My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
	My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Special Formats ⁽⁷⁾	DNA-Technology
Bio Molecular Systems	DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
Mic Real Time PCR Cyclers	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers ⁽⁸⁾
Cepheid	Eppendorf
SmartCycler®	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Precision System Science Co., Ltd.	Qiagen
geneLEAD VIII System	QIAquant 96
Qiagen	
Rotor-Gene® Q	

- (1) A special grid is needed to fit these real-time PCR kits.
- (2) Select Ramp Speed "Standard".
- (3) No ROX caption.
- (4) No Cy5 caption.
- (5) Only FAM and HEX caption.
- (6) Specific compensation color is required.
- (7) The product must be reconstituted following the appropriate procedure (see Test procedure) and transferred to the specific tubes for Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q or geneLEAD VIII System.
- (8) 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:

Thermocycler	Vitassay Channel	Detection Channel	Observations
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	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	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	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	
BIONEER Exicycler™ 96	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
DTIite 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

*If result in FAM channel is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.










Bibliography/Bibliografía

- Buder S., Schöfer H., Meyer T., Bremer V., Kohl P. K., Skaletz-Rorowski A., & Brockmeyer N. (2019). Bacterial sexually transmitted infections. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*, 17(3), 287–315.
- LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. (2012). National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548066/>
- Młynarczyk-Bonikowska, B., Majewska, A., Malejczyk, M., Młynarczyk, G., & Majewski, S. (2020). Multiresistant *Neisseria gonorrhoeae*: a new threat in second decade of the XXI century. *Medical microbiology and immunology*, 209(2), 95–108.
- Quillin, S. J., & Seifert, H. S. (2018). *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. *Nature reviews. Microbiology*, 16(4), 226–240.
- Suay-García, B., & Pérez-Gracia, M. T. (2018). Future Prospects for *Neisseria gonorrhoeae* Treatment. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 7(2), 49.
- Workowski, K. A., Bolan, G. A., & Centers for Disease Control and Prevention (2015). Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports*, 64(RR-03), 1–137.

Trademarks

All trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

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
			Número de referencia Catalogue number



VA Vitassay

Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

www.vitassay.com