

Vitassay

Real-Time PCR Kits

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

Reactivos suministrados

Para las referencias 7041051 y 7042051:

Código	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
7041S051/ 7042S051	Vaginosis strips low/high profile	Lioprotectores y estabilizadores dNTPs Cebadores y sondas Enzimas	-	4 tiras de 8 pocillos
7C051	Vaginosis Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	Agua libre de RNAsa/DNAsa	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	Solución salina Tampón (TRIS, pH)	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	Tapas ópticas para sellar las tiras en el ciclo térmico	-	4 tiras de 8 tapones

Material y equipamiento necesario, 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
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits (antes del uso) puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Una vez en uso ver las condiciones de almacenamiento de cada componente. Evitar agitaciones durante el transporte para prevenir la fuga de líquidos.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. La estabilidad del control positivo se ha validado tras 6 ciclos de congelación y descongelación. Sin embargo, se recomienda distribuir en alícuotas para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación.
- Para el uso adecuado del kit, se recomienda no rehidratar los pocillos que no se necesiten. Los pocillos no utilizados pueden cortarse fácilmente antes de retirar el aluminio protector y almacenarse en las bolsas de aluminio proporcionadas con el gel de sílice dentro y cerradas con el cierre zip para evitar el contacto con la luz o la humedad y guardarse a 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez que los pocillos han sido rehidratados debe realizarse de forma inmediata la adición del ácido nucleico y la qPCR.

- Una vez abiertos los componentes Resuspension buffer, PCR grade water y Negative Control deben ser almacenados a 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Resumen

La vaginosis es una disbiosis bacteriana que suele afectar a las mujeres en edad reproductiva. Descrita a mediados de los años 50 por Gardner y Dukes, que inicialmente la denominaron incorrectamente vaginitis por *Haemophilus vaginalis*. (Gardner and Dukes, 1955). Más tarde se vio que la bacteria causante era ahora del género *Haemophilus*, y se rebautizó como *Gardnerella vaginalis*.

Hoy en día se desconoce la etiología exacta de la vaginosis, y se cree que está causada por un desequilibrio entre el crecimiento excesivo de bacterias oportunistas y la disminución de la presencia de lactobacilos, la flora sana. Se cree que podría ser de transmisión sexual, especialmente en mujeres que tienen relaciones sexuales con mujeres (Bagnall and Rizzolo, 2017; Coudray and Madhivanan, 2020).

Normalmente, las mujeres con vaginosis presentan un flujo vaginal anormal, mal olor, aumento del pH vaginal y picor, que también son comunes en otras infecciones vaginales. Se ha visto que la prevalencia es de alrededor del 23-29% en todas las regiones, y puede incluso llegar a más del 50% en algunas poblaciones específicas (Bautista et al., 2016; Peebles et al., 2019)

Candida albicans

Candida albicans es un microorganismo eucariota con una gran adaptabilidad debido a la extraordinaria capacidad de sufrir un cambio morfogénico: de una célula de levadura redonda-ovoide a un organismo de crecimiento micelial hifal. La forma de levadura (Y) suele asociarse a su estilo de vida comensal, mientras que la forma hifal (H) está más relacionada con la patogenicidad (Cassone et al., 2014).

C. albicans es la etiología más frecuente de la candidiasis vulvovaginal (CVV), un tipo de vaginosis causada por especies de *Candida*. Hasta el 75% de la población femenina experimenta al menos un episodio de CVV, y los episodios recurrentes se dan en alrededor del 5%. Los síntomas son inespecíficos e incluyen flujo vaginal, dolor, irritación, ardor y dispareunia. Hay varios factores de riesgo a tener en cuenta, como la edad reproductiva, el embarazo, la terapia hormonal sustitutiva, el uso de antibióticos, la inmunosupresión, la diabetes no controlada, las píldoras anticonceptivas orales, las relaciones sexuales frecuentes y el sexo oral receptivo (Brown et al., 2019).

Candida spp. no sólo coloniza el tracto genital de las mujeres; también se encuentra en zonas extragenitales, como la cavidad oral y el recto. Aunque no se considera causante de las ITS clásicas, la *Candida* puede transmitirse sexualmente.

Es necesario identificar las especies de *Candida* responsables de las infecciones en todos los pacientes que presentan CVV, especialmente en aquellos con infecciones refractarias. Esta identificación influirá en la selección de los agentes antimicóticos y en la duración del tratamiento. Normalmente, la identificación se realiza mediante técnicas de microscopía, que no es una técnica muy específica. Actualmente se utilizan técnicas de biología molecular, como la PCR, para identificar especies de *Candida* y otros patógenos de transmisión sexual. (Makanjuola et al., 2018).

Gardnerella vaginalis

Como ya se ha mencionado, *Gardnerella vaginalis* fue el primer microorganismo descrito como agente causal de la vaginosis bacteriana (VB), pero también puede aislarse de la vagina de mujeres sanas. Se cree que ciertas cepas de *G. vaginalis* son más patógenas que otras. Los recientes avances en la investigación de la patogénesis de la VB han determinado la existencia de 13 genomoespecies diferentes dentro del género *Gardnerella* (Potter et al., 2019).

Los criterios de Amsel se siguen utilizando clínicamente para el diagnóstico de la VB. En general, se considera que tres de los cuatro criterios siguientes (Amsel) apoyan el diagnóstico de VB: (1) una secreción fina y homogénea, (2) un pH superior a 4,5, (3) la presencia de células epiteliales que parezcan estar recubiertas de bacterias en montaje húmedo, y (4) la detección de olor a pescado, con o sin tratamiento de la muestra con hidróxido potásico al 10% (Morrill et al., 2020). Sin embargo, algunos de los síntomas también pueden deberse fácilmente a otros microorganismos.

La vaginosis bacteriana está relacionada con un gran número de complicaciones obstétricas y ginecológicas, como abortos espontáneos, partos prematuros, enfermedad inflamatoria pélvica subclínica, infecciones de las heridas tras el parto por cesárea, corioamnionitis, rotura prematura de membranas, endometritis posparto e infecciones posquirúrgicas. Además, la vaginosis bacteriana se asocia a un mayor riesgo de contraer infecciones de transmisión sexual, incluido el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Con el fin de mejorar la detección de *Gardnerella* y, por tanto, un diagnóstico adecuado, se han desarrollado métodos moleculares. Algunos de los qPCR son incluso capaces de distinguir entre las diferentes especies de bacterias de este género (Balashov et al., 2014) o entre otras diferentes vinculadas a BV (Singh et al., 2020).

Trichomonas vaginalis

T. vaginalis es un protozoo unicelular flagelado y parásito humano causante de la infección de transmisión sexual no vírica más prevalente en todo el mundo. La tricomoniasis es un problema sanitario mundial muy extendido y se produce a un ritmo cada vez mayor. Por ejemplo, los CDC han calculado que en Estados Unidos se produjeron 2,6 millones de infecciones por tricomoniasis en 2018 (CDC).

En las mujeres, las infecciones genitales pueden presentar una plétora de manifestaciones, como vaginitis y cervicitis. Por otro lado, las infecciones en varones suelen ser asintomáticas, con uretritis leve esporádica o prostatitis. En las últimas décadas, la infección por *T. vaginalis* se ha asociado a complicaciones como el cáncer cervical y de próstata, resultados adversos en el embarazo y una mayor probabilidad de infección por VIH. Por lo tanto, se requiere un diagnóstico adecuado, pero es un asunto delicado, ya que los síntomas son similares a los causados por *N. gonorrhoeae* y *Mycoplasma genitalium*, por ejemplo (Edwards et al., 2014). En la *T. vaginalis* se observa un desequilibrio de la flora vaginal normal de lactobacilos, así como un aumento del pH vaginal, una característica común observada en la *Gardnerella* y en el sobrecrecimiento de otras bacterias relacionadas con la vaginosis.

Se han utilizado diversos métodos para diagnosticar la tricomoniasis, como el montaje húmedo y el cultivo. Sin embargo, la PCR se considera una tecnología altamente sensible y específica que permite además la diferenciación simultánea con otros microorganismos de transmisión sexual (Noh et al., 2019).

Principio de la prueba

Vitassay qPCR Vaginosis se basa en la amplificación a tiempo real de una secuencia repetida de 2 kb específica de *Trichomonas vaginalis*, de una región conservada del gen 5.8S rRNA para *Candida albicans* y del 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.

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrólisis 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 Vaginosis, 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. Los canales de detección de las secuencias diana se describen a continuación:

Diana	Canal detección
Secuencia repetida de 2 kb específica de <i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM
Gen 5.8S rRNA (<i>Candida albicans</i>)	ROX
Gen 16S rRNA (<i>Gardnerella vaginalis</i>)	Cy5
Control interno (CI)	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 utilizar el kit sin haber leído y entendido la información sobre procedimientos, precauciones y limitaciones proporcionada en las instrucciones de uso.
- 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.
- Utilizar las tiras inmediatamente después de haber retirado el aluminio protector para proteger la mezcla de reacción de la luz solar. No se recomienda dejar las tiras abiertas sin resuspender. Una vez rehidratados los pocillos requeridos, se debe llevar a cabo el ensayo qPCR inmediatamente.
- Se recomienda cortar los pocillos requeridos/necesarios antes de retirar el sello protector de toda la tira. Guardar el resto dentro de la bolsa con el desecante.

- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip después de cada uso (no retirar las bolsas de desecante del sobre). Elimine el exceso de aire de las bolsas antes de sellar.
- No usar el producto cerca de disolventes, con el fin de evitar el deterioro de la etiqueta/marcaje.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Rehidratar los viales inmediatamente después de abrir el sobre del Control positivo y utilizarlos en la reacción de PCR o conservarlos adecuadamente. Dejar el vial abierto sin resuspender puede ocasionar el deterioro del reactivo.
- 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. Una vez finalizada la prueba lávese bien las manos.
- 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 sobre residuos sanitarios nacional 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. Para cada muestra debe usarse una punta nueva. Es necesario cambiar de guantes antes de manipular los reactivos.
- 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.
- El producto Vitassay qPCR Vaginosis solamente se ha validado con los equipos mencionados en el Apartado Termocicladores compatibles de estas Instrucciones de uso.
- Debe asegurarse de que la configuración de las condiciones en el termociclador se realiza siguiendo las instrucciones de la sección "Programación del termociclador".
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud de las mismas.

Procedimiento

Toma, transporte y conservación de muestras

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:

- MagDEA Dx SV kit, utilizando el magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co).
- 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). Se recomienda no rehidratar los pocillos que no se necesiten. Los pocillos no utilizados pueden cortarse fácilmente antes de retirar el aluminio protector y almacenarse como se indica en la Sección Condiciones de Transporte y conservación.
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras a utilizar.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído de cada muestra, Control Negativo (tubo amarillo) o Control positivo reconstituido (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con las tapas ópticas suministradas. Se recomienda centrifugar brevemente.
- 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/elongación (*) a través de los canales FAM (*Trichomonas vaginalis*), ROX (*Candida albicans*), Cy5 (*Gardnerella vaginalis*) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado.

Análisis e interpretación de resultados

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

Se recomienda establecer en cada ensayo los valores umbral para cada canal (diana) de forma independiente por el usuario final. Para ello, seleccione el pocillo correspondiente al control positivo para cada canal y fije el valor umbral dentro de la fase exponencial de la curva de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo (por debajo de la línea base). En el caso de que el equipo utilizado establezca un umbral automáticamente, compruebe y verifique que se ajusta al control positivo o ajústelo manualmente. Una vez fijado el valor umbral, se pueden interpretar las muestras del ensayo.

La naturaleza química de los diferentes fluoróforos puede afectar al valor umbral de los canales, así como las diferentes intensidades de señal pueden influir en el valor umbral para diferentes instrumentos.

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 ($Ct \leq 20-30$) en los canales de FAM (*Trichomonas vaginalis*), ROX (*Candida albicans*), y Cy5 (*Gardnerella vaginalis*).

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal ($Ct > 40$ o no señal) de FAM (*Trichomonas vaginalis*), y ROX (*Candida albicans*), y también ausencia de señal ($Ct > 36$ o no señal) de Cy5 (*Gardnerella vaginalis*).

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

El experimento es inválido si hay ausencia de señal en el control positivo o hay señal de amplificación en el control negativo, exceptuando el canal HEX, VIC o JOE que ha de mostrar amplificación (correspondiente al CI). En cualquiera de estos supuestos, el ensayo se debe de repetir.

Una vez validado el resultado de los controles, para la interpretación de los resultados de las muestras, **seleccione solo los canales donde se detectan las dianas** y con la ayuda de la siguiente tabla analizar los resultados:

Control Negativo	Control Positivo	<i>Trichomonas vaginalis</i> (FAM)	<i>Candida albicans</i> (ROX)	<i>Gardnerella vaginalis</i> (Cy5)	Control Interno (HEX)	Interpretación
-	+	+	+	+ ³	+ ¹	DNA de <i>T. vaginalis</i> , <i>C. albicans</i> y <i>G. vaginalis</i> Detectado
-	+	-	-	- ³	+ ²	DNA de las dianas No detectado
-	+	+	-	- ³	+ ¹	DNA de <i>T. vaginalis</i> Detectado, DNA de <i>C. albicans</i> y <i>G. vaginalis</i> No detectado
-	+	+	+	- ³	+ ¹	DNA de <i>T. vaginalis</i> y <i>C. albicans</i> Detectado, DNA de <i>G. vaginalis</i> No detectado
-	+	+	-	+ ³	+ ¹	DNA de <i>T. vaginalis</i> y <i>G. vaginalis</i> Detectado, DNA de <i>C. albicans</i> No detectado
-	+	-	+	- ³	+ ¹	DNA de <i>C. albicans</i> Detectado, DNA de <i>T. vaginalis</i> y <i>G. vaginalis</i> No detectado
-	+	-	+	+ ³	+ ¹	DNA de <i>C. albicans</i> y <i>G. vaginalis</i> Detectado, DNA de <i>T. vaginalis</i> No detectado
-	+	-	-	+ ³	+ ¹	DNA de <i>G. vaginalis</i> Detectado, DNA de <i>T. vaginalis</i> y <i>C. albicans</i> No detectado
-	+	-	-	- ³	- ²	Inválido

Positivo (+): Señal de amplificación (Ct ≤40), excepto para ^{1,2,3}.

Negativo (-): No hay señal de amplificación (Ct >40 o no señal), excepto para ^{1,2,3}.

¹ El control interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40). En ocasiones, en el caso de las muestras clínicas, la detección del control interno no ocurre ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. En caso de que una de las dianas presente un número elevado de copias, el resto de las dianas permanezcan negativas, y el Control Interno no muestre señal de amplificación, no se pueden descartar falsos negativos de otras dianas. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10.

² En el caso de que los genes diana de *T. vaginalis*, *C. albicans*, y *G. vaginalis* resulten negativos, el Control Interno 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 "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1: 100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

³ Para *G. vaginalis* se ha establecido un Ct de corte de 36. Así:

(+) Positivo: Señal de amplificación (Ct ≤36)

(-) Negativo: No hay señal de amplificación (Ct >36 o no señal)

En caso de un resultado de interpretación confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, el proceso de extracción utilizado, revisar las instrucciones de uso, 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. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo preferiblemente por duplicado en función del material disponible: a) obtener un nuevo espécimen, volver a extraer y testar (ideal), b) volver a extraer y testar otra alícuota de la misma muestra o, c) repetir la qPCR con la misma muestra de DNA aislada.

NOTA: 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 de la prueba deben ser evaluados por un profesional sanitario, en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas diagnósticas.

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 deben incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

La sensibilidad y especificidad clínicas de Vitassay qPCR Vaginosis se comprobaron en dos evaluaciones.

Se realizó un primer estudio para evaluar la funcionalidad del kit con restos de 232 muestras del tracto urogenital. Estas muestras se recogieron de pacientes sintomáticos (principalmente mujeres, pero también hombres) con sospecha de infección o disbiosis. Tras el análisis rutinario mediante microscopía y técnica de cultivo en caldo, los restos se extrajeron con reactivos MagDEA® Dx utilizando el extractor de ácido nucleico MagLEAD® 12gC (instrumentos PSS) y se analizaron con el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96™ Touch (Bio-Rad). Las discrepancias entre el diagnóstico inicial y la qPCR de Vitassay se analizaron con un kit de panel de PCR en tiempo real disponible en el mercado. Los resultados obtenidos tras el análisis de los resultados discrepantes fueron los siguientes:

Microorganismo	OPA	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
<i>C. albicans</i>	99.13%	88	142	0	2	0.97 (0.91-0.99)	1 (0.96-1)	1 (0.94-1)	0.98 (0.94-0.99)
<i>G. vaginalis</i>	99.13%	152	78	2	0	1 (0.96-1)	0.97 (0.90-0.99)	0.98 (0.94-0.99)	1 (0.94-1)
<i>T. vaginalis</i>	99.56%	54	177	1	0	1 (0.91-1)	0.99 (0.96-0.99)	0.98 (0.89-0.99)	1 (0.97-1)

Resultados de Vitassay qPCR Vaginosis comparados con el método de referencia en muestras urogenitales tras el análisis de resultados discrepantes.

Se realizó un segundo estudio para evaluar la sensibilidad y especificidad clínicas del kit con restos de 240 muestras vaginales de mujeres con sospecha de flujo vaginal anormal. Tras el análisis rutinario mediante cultivo, microscopía y dos kits moleculares disponibles en el mercado con marcado CE, los restos se extrajeron con reactivos MagDEA® Dx utilizando el extractor de ácido nucleico MagLEAD® 12gC (instrumentos PSS) y se analizaron con el instrumento de PCR en tiempo real DTPrime (DNA-Technology). Las discrepancias entre el diagnóstico inicial y la qPCR de Vitassay se analizaron con un método diferente del empleado inicialmente. Los resultados obtenidos tras el análisis de los resultados discrepantes fueron los siguientes:

Microorganismo	Overall agreement	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
<i>C. albicans</i>	0.97 (0.95-0.99)	74	161	5	0	1 (0.95-1)	0.97 (0.93-0.99)	0.93 (0.85-0.97)	1 (0.97-1)
<i>G. vaginalis</i>	0.94 (0.90-0.96)	164	62	14	0	1 (0.97-1)	0.81 (0.71-0.90)	0.92 (0.87-0.95)	1 (0.94-1)
<i>T. vaginalis</i>	1 (0.98-1)	46	194	0	0	1 (0.92-1)	1 (0.98-1)	1 (0.90-1)	1 (0.97-1)

Resultados de Vitassay qPCR Vaginosis comparados con los métodos de referencia en muestras vaginales tras el análisis de resultados discrepantes.

En resumen, el rendimiento clínico de Vitassay qPCR Vaginosis se evaluó comparándolo con métodos convencionales y moleculares realizados para el diagnóstico rutinario en entornos hospitalarios. Los valores medios de sensibilidad y especificidad obtenidos del rendimiento clínico de Vitassay qPCR Vaginosis, fueron los siguientes :

Diana	Métodos convencionales (cultivo + microscopía)		Método molecular de referencia (Real time PCR)	
	SE	SP	SE	SP
<i>T. vaginalis</i>	1 (0.93-1)	0.99 (0.96-1)	1 (0.92-1)	1 (0.98-1)
<i>C. albicans</i>	0.98 (0.95-0.99)	0.97 (0.93-0.99)	1 (0.95-1)	0.97 (0.93-0.99)
<i>G. vaginalis</i>	1 (0.98-1)	0.89(0.83-0.94)	1 (0.97-1)	0.81 (0.71-0.90)

Valores medios de los resultados de Vitassay qPCR Vaginosis para *T. vaginalis*, *C. albicans* y *G. vaginalis* en comparación con los métodos convencionales y los métodos moleculares de referencia.

Vitassay qPCR Vaginosis representa una herramienta eficaz para la detección de ADN de *C. albicans*, *G. vaginalis* y *T. vaginalis*, ya que muestra una alta sensibilidad y especificidad en muestras del tracto genitourinario.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas de estándares de los diferentes patógenos (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción para *T. vaginalis*, *C. albicans*, y *G. vaginalis*.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* y *Trichomonas vaginalis* se confirmó probando el panel de microorganismos siguiente, donde no se observó reactividad cruzada entre ninguno de los microorganismos, excepto para los microorganismos diana:

Pruebas de reactividad cruzada					
<i>Candida albicans</i>	-/+	<i>Escherichia coli</i> O.1285; O18:H7:K1	-	Papilomavirus 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

La reactividad analítica de Vitassay qPCR Vaginosis para *C. albicans* se evaluó frente a *Candida albicans*, obteniéndose un resultado positivo.

La reactividad analítica de Vitassay qPCR Vaginosis para *G. vaginalis* se evaluó frente a *Gardnerella vaginalis* obteniéndose un resultado positivo.

La reactividad analítica de Vitassay qPCR Vaginosis para *T. vaginalis* se evaluó frente a *Trichomonas vaginalis* obteniéndose un resultado positivo.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Vaginosis ha sido validado en los siguientes equipos:

- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)

Vitassay qPCR Vaginosis ha sido testado en los siguientes equipos:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen) ^I

I: Para el equipo Rotor-Gene® Q el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos del equipo.

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).

Para más información sobre la compatibilidad del termociclador basada en datos bibliográficos y los canales de detección más comunes, contactar con el fabricante (info@vitassay.com).

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 instrument (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time PCR instrument (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.

Limitaciones

- Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional sanitario, en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas diagnósticas.
- Un resultado positivo para *C. albicans* y/o *G. vaginalis* no es necesariamente indicativo de una candidiasis vulvovaginal o vaginosis bacteriana (respectivamente), ya que *C. albicans* y *G. vaginalis* pueden formar parte de la microbiota vaginal en mujeres sanas.
- Este ensayo ha sido validado con DNA extraído de hisopos vaginales y uretrales. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; los ácidos nucleicos deben ser extraídos de forma adecuada de las muestras clínicas humanas.
- Es posible observar fenómenos “crosstalk” en canales vacíos del termociclador (en el caso de que no haya diana que detectar), por tanto, es necesario que al interpretar los resultados se seleccionen solo los canales donde las dianas amplifican.
- En ocasiones se pueden detectar ácidos nucleicos molde diana con un número de copias inferior al límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Esta prueba no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. No es posible correlacionar los valores Ct obtenidos en la PCR con la concentración de la muestra, ya que éstos dependen del termociclador utilizado y de la propia ejecución. Esta prueba es un ensayo cualitativo.

- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *C. albicans*, *G. vaginalis* y/o *T. vaginalis*, ya sea por el control positivo durante su reconstitución, por muestras que contienen altas concentraciones de los ácidos nucleicos 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 la extracción de los ácidos nucleicos); c) Degradación de los ácidos nucleicos durante el envío, almacenamiento y/o preparación de muestras; d) la carga del microorganismo esté por debajo del límite de detección del ensayo; e) presencia de inhibidores de la amplificación en tiempo real u otros tipos de sustancias interferentes (no se realizó un estudio de interferencia que evaluara el efecto de vacunas, de algunas terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos, fármacos inmunosupresores o antifúngicos utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma); f) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante; g) mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de cepas nuevas o desconocidas.
- La detección de los ácidos nucleicos no implica la presencia de microorganismos viables y/o infecciosos ni que estos microorganismos sean los agentes causantes de los síntomas clínicos.
- Los resultados negativos no impiden la infección por *C. albicans*, *G. vaginalis* y/o *T. vaginalis* y no deben ser la única base de una decisión de tratamiento/manejo del paciente. Aún no se han establecido los tipos de muestras óptimas para la identificación de *C. albicans*, *G. vaginalis* y/o *T. vaginalis* 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 los microorganismos.
- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con estos microorganismos, y se han descartado otras enfermedades, la posibilidad de un resultado falso negativo no debería desestimarse y se deberían realizar pruebas adicionales.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como el equipo de PCR (incluso si es el mismo modelo), el sistema de extracción, el tipo de muestra y su tratamiento previo, entre otros.



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

Reagents provided

In references 7041051 and 7042051:

Reference	Reagent/Material	Description	Colour	Amount
7041S051/ 7042S051	Vaginosis strips low/high profile	Lyoprotectors and Stabilizers	-	4 x 8-well strips
		dNTPs		
		Primers and Probes		
		Enzymes		
7C051	Vaginosis Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	red	1 vial
7001A	PCR grade water	RNAsa/DNAsa free water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	Saline Solution	green	1 vial x 1,8 mL
		Buffer (TRIS, pH)		
7003N	Negative control	RNAsa/DNAsa free water	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	Optical caps for sealing strips during thermal cycling	-	4 x 8-cap strips

Material and equipment required, not provided

- Collection and transport system.
- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C).
- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortex
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Transport and storage

- Transport and storage of the kits (before use) can be performed at 2-40°C until the expiry date stated on the label. Once in use, see storage conditions for each component. Avoid shaking during transport to prevent liquid leakage.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C until the expiry date stated on the kit label. The stability of the positive control has been validated after 6 freeze-thaw cycles. However, it is recommended to distribute in aliquots to avoid repeated freeze-thaw cycles.
- For proper use of the kit, it is recommended that unneeded wells are not rehydrated. Unused wells can be easily cut before removing the protective foil and stored in the foil bags provided with the silica gel inside and closed with the zip closure to avoid contact with light or moisture and stored at 2-40°C for the shelf life indicated on the kit label. Once the wells have been rehydrated, nucleic acid addition and qPCR should be performed immediately.
- Once opened, the Resuspension buffer, PCR grade water and Negative Control components should be stored at 2-40°C for the shelf life indicated on the kit label.
- Keep all reagents in the darkness.

Summary

Vaginosis is a bacterial dysbiosis commonly affecting women of reproductive age. Described in the mid-50s by Gardner and Dukes, who initially incorrectly named the condition as *Haemophilus vaginalis* vaginitis (Gardner and Dukes, 1955). It was later seen that the causing bacteria was now from the genus *Haemophilus*, and it was renamed as *Gardnerella vaginalis*.

Nowadays the accurate aetiology of vaginosis is not known, and it is believed to be caused by an imbalance between the overgrowth of opportunistic bacteria and a decrease in the presence of *Lactobacilli*, the healthy flora. It is thought that it might be sexually transmitted, especially in women having sex with women (Bagnall and Rizzolo, 2017; Coudray and Madhivanan, 2020).

Typically, women with vaginosis present an abnormal vaginal discharge, malodor, increased vaginal pH and itching, which are also common in other vaginal infections. It has been seen that prevalence is of around 23-29% across regions, and it can be even reach more than 50% in some specific populations. (Bautista et al., 2016; Peebles et al., 2019)

Candida albicans

Candida albicans is a eukaryotic microorganism with a great adaptability due to the extraordinary capacity of undergoing a morphogenic change from a round-ovoid yeast cell to a hyphal mycelial growing organism. The yeast form (Y) is usually associated with its commensal lifestyle, whereas the hyphal (H) form is more related to pathogenicity (Cassone et al., 2014).

C. albicans is the most aetiology of Vulvovaginal candidiasis (VVC), a type of vaginosis caused by *Candida* species. Up to the 75% of women population would experience at least one episode of VVC, and the recurrent episodes occurs in around 5%. Symptoms are nonspecific and include vaginal discharge, soreness, irritation, burning, and dyspareunia. There are several risk factors to take into account, including reproductive age, pregnancy, hormone replacement therapy, antibiotic use, immunosuppression, uncontrolled diabetes, oral contraceptive pills, frequent sexual intercourse, and receptive oral sex (Brown et al., 2019).

Candida spp. not only colonise the genital tract of women; it is also found in extragenital areas, like the oral cavity and the rectum. Despite not being considered to cause classical STIs, *Candida* can be sexually transmitted.

It is necessary to identify the *Candida* species responsible for infections in all patients presenting with VVC especially those with refractory infections. Such identification will influence antimycotic agents' selection and duration of therapy. Typically, identification is performed by microscopy techniques, which is not a very specific technique. Molecular biology techniques, such as PCR, are now being used to identify *Candida* species and other sexually transmitted pathogens (Makanjuola et al., 2018).

Gardnerella vaginalis

As aforementioned, *Gardnerella vaginalis* was the first microorganism described as a causative agent of bacterial vaginosis (BV), but it can also be isolated from the vagina of healthy women. It is believed that certain strains of *G. vaginalis* are more pathogenic than others. Recent advances in BV pathogenesis research have determined the existence of 13 different genomospecies within the genus *Gardnerella* (Potter et al., 2019).

Amsel criteria is still used clinically for the diagnosis of BV. Three of four of the following (Amsel) criteria are generally considered to support the diagnosis of BV: (1) a thin, homogenous discharge, (2) pH over 4.5, (3) the presence of epithelial cells that appeared to be coated in bacteria in wet mount, and (4) the detection of a fishy odor, with or without treatment of the sample with 10% potassium hydroxide (Morrill et al., 2020). However, some of the symptoms can easily be also due to other microorganisms.

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).

With the aim of improving the detection of *Gardnerella*, and hence, a proper diagnosis, molecular methods have been developed. Some of the qPCRs are even able to distinguish between the different bacteria species of this genus (Balashov et al., 2014) or between different others linked to BV (Singh et al., 2020)

Trichomonas vaginalis

T. vaginalis is a one-celled flagellated protozoan and human parasite causing the most prevalent non-viral sexually transmitted infection worldwide. Trichomoniasis is a widespread, global health concern and occurring at an increasing rate. For example, CDC has calculated that in the US, there were 2.6 million trichomoniasis infections in 2018 (CDC).

In females, the genital infections can display a plethora of manifestations such as including vaginitis and cervicitis. On the other hand, infections in males are generally asymptomatic, with sporadic mild urethritis or prostatitis. Importantly, during the last decades, *T. vaginalis* infection has been associated with complications such as cervical and prostate cancer, adverse pregnancy outcomes and an increased likelihood of HIV infection. Thus, a proper diagnosis is required but is a tricky matter, since the symptoms are similar to the ones caused by *N. gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium*, for example (Edwards et al., 2014). An imbalance of the normal

lactobacilli vaginal flora is observed in *T. vaginalis*, as well as an increased of vaginal pH, a common feature observed in *Gardnerella* and other vaginosis-related bacteria overgrowth.

Various methods have been used to diagnose trichomoniasis, such as wet mount and culture. Nevertheless, PCR is considered to be highly sensitive and specific technology that also allows the simultaneous differentiation with other sexually transmitted microorganisms (Noh et al., 2019).

Test principle

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.

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 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 detection channels of the target sequences are described as follows:

Target	Detection channel
<i>Trichomonas vaginalis</i> -specific 2-kb repeated sequence	FAM
5.8S rRNA gene (<i>Candida albicans</i>)	ROX
16S rRNA gene (<i>Gardnerella vaginalis</i>)	Cy5
Internal Control (IC)	HEX, VIC, or JOE (depending on the equipment used)

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use the kit after the expiration date.
- Do not use the kit without having read and understood the information on procedures, precautions, and limitations provided in the instructions for use.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if the 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.
- Use the strips immediately after removing the protective foil to protect the reaction mixture from sunlight. It is not recommended to leave the strips open without resuspending. Once the required wells have been rehydrated, the qPCR assay should be performed immediately.
- It is recommended to cut the required/necessary wells before removing the protective seal from the entire strip. Store the rest inside the bag with the desiccant.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (do not remove the desiccant from the pouches). Remove excess air from the bags before sealing.
- Do not use the product near solvents to avoid deterioration of the label/markings.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Rehydrate the vial immediately after opening the Positive Control envelope and use it in the PCR reaction or store it properly. Leaving the vial open without resuspending may cause deterioration of the reagent.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles, and mask.
- Do not eat, drink, or smoke in the working area. Once the test is completed wash your hands thoroughly.
- 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.
- 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. A new tip should be used for each sample. It is necessary to change gloves before handling the reagents.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or colour different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- Use personal protective equipment (PPE) and biological safety cabinet for handling of potentially infectious samples and reagents according to current recommendations.
- The product Vitassay qPCR Vaginosis has only been validated with the equipment mentioned in Section Compatibles real-time PCR equipment of this Instructions for Use.
- You must ensure that the conditions are set up in the thermal cycler according to the instructions in section "Programme your thermocycler".
- Refer to Safety data sheets, available on request.

Procedures

Specimen collection, transport, and conservation

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. Follow the manufacturer's instructions for use. The assay has been validated with the following extraction kits:

- MagDEA Dx SV kit using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co).
- 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 to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains a high-copy number template and entails a very significant contamination risk. Therefore, we recommend opening and manipulating it in a separate area of the laboratory 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.
It is recommended not to rehydrate wells that are not needed. Unused wells can be easily cut before removing the protective foil and stored as indicated in the Transport and Storage Section.
- Peel off protective aluminium seal from the strips to be used.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of DNA extracted from each sample, of negative control (yellow tube) or of reconstituted positive control (red tube) and add them into the corresponding wells.
- Cover the wells with the optical caps provided. It is recommended spin down briefly.
- 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 Annealing/extension step (*) through the FAM (*Trichomonas vaginalis*), ROX (*Candida albicans*), Cy5 (*Gardnerella vaginalis*) and HEX, JOE, or VIC channels (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel.

Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is performed 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 signal emission.

For each assay, it is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end-user. To do so, select the well corresponding to the positive control for each channel and set the threshold value within the exponential phase of the fluorescence curve and above any background signal (below the baseline). In case a threshold is set automatically by the equipment used, check, and verify that it is adjusted to the positive control or adjust it manually. Once the threshold value is set, the test samples can be interpreted.

The chemical nature of the different fluorophores can affect the threshold value of the channels, just as different signal intensities can influence the threshold value for different instruments.

For a valid diagnostic test run, before analyzing the result of the clinical samples, the following control conditions must be met:

Positive control

The positive control used in each run must show an amplification curve (Ct ≤20-30) in FAM (*Trichomonas vaginalis*), ROX (*Candida albicans*), and Cy5 (*Gardnerella vaginalis*), which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run must show the absence of signal (Ct >40 or no signal) in FAM (*Trichomonas vaginalis*), and ROX (*Candida albicans*), and must also show absence of signal (Ct >36 or no signal) in Cy5 (*Gardnerella vaginalis*), which validates the reaction.

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

The experiment is invalid if there is no signal in the positive control or is amplification signal in the negative control, except for the HEX, JOE or VIC channel which should show amplification signal (corresponding to Internal Control). In either case, the assay must be repeated.

Once the results of the controls have been validated, for the interpretation of the sample results **select only the channels where the targets are detected**. The result interpretation is summarized in the following table:

Negative Control	Positive Control	<i>Trichomonas vaginalis</i> (FAM)	<i>Candida albicans</i> (ROX)	<i>Gardnerella vaginalis</i> (Cy5)	Internal Control (HEX)	Interpretation
-	+	+	+	+ ³	+ ¹	<i>T. vaginalis</i> , <i>C. albicans</i> and <i>G. vaginalis</i> DNA Detected
-	+	-	-	- ³	+ ²	Targets' DNA Not detected
-	+	+	-	- ³	+ ¹	<i>T. vaginalis</i> DNA Detected, <i>C. albicans</i> and <i>G. vaginalis</i> DNA Not detected
-	+	+	+	- ³	+ ¹	<i>T. vaginalis</i> and <i>C. albicans</i> DNA Detected, <i>G. vaginalis</i> DNA Not detected
-	+	+	-	+ ³	+ ¹	<i>T. vaginalis</i> and <i>G. vaginalis</i> DNA Detected, <i>C. albicans</i> DNA Not detected
-	+	-	+	- ³	+ ¹	<i>C. albicans</i> DNA Detected, <i>T. vaginalis</i> and <i>G. vaginalis</i> DNA Not detected
-	+	-	+	+ ³	+ ¹	<i>C. albicans</i> and <i>G. vaginalis</i> DNA Detected, <i>T. vaginalis</i> DNA Not detected
-	+	-	-	+ ³	+ ¹	<i>G. vaginalis</i> DNA Detected, <i>T. vaginalis</i> and <i>C. albicans</i> DNA Not detected
-	+	-	-	- ³	- ²	Invalid

Positive (+): Amplification signal (Ct ≤40), except for ^{1,2,3}.

Negative (-): No amplification signal (Ct >40 or no signal), except for ^{1,2,3}.

¹ The internal control (IC) should show an amplification signal (Ct ≤40). Sometimes, in the case of clinical samples, detection of the internal control does not occur as the presence of a high initial copy number of the target nucleic acid may cause preferential amplification of the target-specific nucleic acids. In case of one of the targets presents a high number of copies, the rest of targets remain negative, and the Internal Control does not show amplification signal, false negatives of other targets cannot be discarded. It is recommended to repeat the qPCR by diluting the DNA sample 1:10.

² In case the *T. vaginalis*, *C. albicans*, and *G. vaginalis* target genes are negative, the Internal Control should show an amplification signal with Ct ≤ 35. In case of no signal or Ct value > 35 of the 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 repeat the assay to check for possible failure of the extraction procedure and/or inhibition problems.

³ For *G. vaginalis* a cut-off Ct of 36 has been established. Thus:

(+) Positive: Amplification signal (Ct ≤36)

(-) Negative: No amplification signal (Ct >36 or no signal)

In case of an unclear or doubtful interpretation result, it is necessary to check that all steps have been performed correctly, the extraction process used, check the instructions for use, verify the correct performance of each qPCR step, check all parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence intensity. If the situation is not resolved, it is recommended to repeat the test preferably in duplicate depending on the available material: (a) obtain a new specimen, re-extract, and re-test (ideal), (b) re-extract and re-test another aliquot of the same sample, or (c) repeat the qPCR with the same isolated DNA sample.

NOTE: 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 test results should be evaluated by a healthcare professional, in the context of the medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

Quality Control

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 clinical sensitivity and specificity was tested within two evaluations.

A first study was conducted to evaluate the kit's functionality with leftovers of 232 urogenital tract samples. These samples were collected from symptomatic patients (mainly women but also men) with suspected infection or dysbiosis. After routine analysis by microscopy and broth culture technique, the leftovers were extracted with MagDEA® Dx reagents using the MagLEAD® 12gC nucleic acid extractor (PSS instruments) and analysed with the CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Discrepancies between the initial diagnosis and Vitassay qPCR were tested with a commercially available real-time PCR panel kit. The obtained results after the analysis of discrepant results were as follows:

Microorganism	OPA	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
<i>C. albicans</i>	99.13%	88	142	0	2	0.97 (0.91-0.99)	1 (0.96-1)	1 (0.94-1)	0.98 (0.94-0.99)
<i>G. vaginalis</i>	99.13%	152	78	2	0	1 (0.96-1)	0.97 (0.90-0.99)	0.98 (0.94-0.99)	1 (0.94-1)
<i>T. vaginalis</i>	99.56%	54	177	1	0	1 (0.91-1)	0.99 (0.96-0.99)	0.98 (0.89-0.99)	1 (0.97-1)

Results of Vitassay qPCR Vaginosis compared to the reference method in urogenital samples after the analysis of discrepant results.

A second study was conducted to evaluate the kit's clinical sensitivity and specificity with leftovers of 240 vaginal samples from women with suspected abnormal vaginal discharge. After routine analysis by culture, microscopy, and two molecular CE-marked commercially available kits, the leftovers were extracted with MagDEA® Dx reagents using the MagLEAD® 12gC nucleic acid extractor (PSS instruments) and analysed with the DTPrime real-time PCR instrument (DNA-Technology). Discrepancies between the initial diagnosis and Vitassay qPCR were tested with a different method from the one initially employed. The results obtained after the analysis of discrepant results were as follows:

Microorganism	Overall agreement	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
<i>C. albicans</i>	0.97 (0.95-0.99)	74	161	5	0	1 (0.95-1)	0.97 (0.93-0.99)	0.93 (0.85-0.97)	1 (0.97-1)
<i>G. vaginalis</i>	0.94 (0.90-0.96)	164	62	14	0	1 (0.97-1)	0.81 (0.71-0.90)	0.92 (0.87-0.95)	1 (0.94-1)
<i>T. vaginalis</i>	1 (0.98-1)	46	194	0	0	1 (0.92-1)	1 (0.98-1)	1 (0.90-1)	1 (0.97-1)

Results of Vitassay qPCR Vaginosis compared to the reference methods in vaginal samples after the analysis of discrepant results.

To sum up, the clinical performance of Vitassay qPCR Vaginosis was evaluated by comparing it with conventional and molecular methods performed for routine diagnosis in hospital settings. The mean values for sensitivity and specificity obtained from the clinical performance of Vitassay qPCR Vaginosis, were as follows:

Target	Conventional methods (culture +microscopy)		Molecular reference method (real time PCR)	
	SE	SP	SE	SP
<i>T. vaginalis</i>	1 (0.93-1)	0.99 (0.96-1)	1 (0.92-1)	1 (0.98-1)
<i>C. albicans</i>	0.98 (0.95-0.99)	0.97 (0.93-0.99)	1 (0.95-1)	0.97 (0.93-0.99)
<i>G. vaginalis</i>	1 (0.98-1)	0.89(0.83-0.94)	1 (0.97-1)	0.81 (0.71-0.90)

Mean values of the Vitassay qPCR Vaginosis results for *T. vaginalis*, *C. albicans* and *G. vaginalis* compared to conventional methods and molecular reference methods.

Vitassay qPCR Vaginosis represents an efficient tool for the detection of *C. albicans*, *G. vaginalis* and *T. vaginalis* DNA, as it shows a high sensitivity and specificity in genitourinary tract samples.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of serial dilutions of *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis* standards (10^7 to 10^1 copies/reaction). This assay has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction for *T. vaginalis*, *C. albicans*, and *G. vaginalis*.

Analytical specificity

The analytical specificity for *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis* was confirmed by testing the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was observed between any of the microorganisms, except for the targeted microorganisms:

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 *C. albicans* was evaluated against *Candida albicans*, showing positive result.

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

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

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Vaginosis has been validated on the following equipment:

- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)

Vitassay qPCR Vaginosis has been tested on the following equipment:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen) ^I

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

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

For more information regarding thermocycler compatibility based on bibliographic data and the most common detection channels contact the manufacturer (info@vitassay.com).

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 instrument (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time PCR instrument (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.

Limitations

- The test results should be evaluated by a healthcare professional, in the context of the medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- A positive test result for *C. albicans* and/or *G. vaginalis* does not necessarily indicate vulvovaginal candidiasis or bacterial vaginosis (respectively), since *C. albicans* and *G. vaginalis* can be part of the vaginal microbiota in healthy women.
- This assay has been validated with DNA extracted from vaginal and urethral swabs. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper nucleic acids from clinical specimens must be extracted.
- Possible crosstalk phenomena might be observed in empty channels of the thermocycler (if there is no target to be detected), therefore, when interpreting the results, it is necessary to select only those channels where the targets amplify.
- Occasionally, target template nucleic acids with a copy number below the detection limit can be detected, but the results may not be reproducible.
- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. It is not possible to correlate the Ct values obtained in the PCR with the concentration of the sample, as these depend on the thermal cycler used and the run itself. This is a qualitative test.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *C. albicans*, *T. vaginalis* and/or *G. vaginalis*, either by the positive control reconstitution, by samples containing high concentrations of target nucleic acids 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 nucleic acids extraction); c) nucleic acids degradation during specimen shipping, storage, and/or preparation; d) microorganism load is below the limit of detection for the assay; e) the presence of Real-Time amplification inhibitors or other types of interference substances (an interference study evaluating the effect of vaccines, some antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics,

immunosuppressant drugs or antifungals used to prevent the infection or used during the treatment of the infection was not performed); f) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures; g) mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect the detection of new or unknown strains.

- The detection of nucleic acids does not imply the presence of viable and/or infectious microorganisms or that these microorganisms are the causative agents of clinical symptoms.
- Negative results do not preclude *C. albicans*, *T. vaginalis* and/or *G. vaginalis* infection and should not be the sole basis for a patient management/treatment decision. The optimal specimen types for *C. albicans*, *T. vaginalis* and/or *G. vaginalis* identification and/or the most appropriate stage of infection for collection have not yet been established. Consider collecting multiple samples from the same patient at different times, which may increase the likelihood of detecting the microorganism(s).
- If the patient's clinical data, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible infection by these microorganisms, and other diseases have been discarded, a false negative result might not be dismissed, and additional tests should be performed.
- The fluorescence values may vary due to multiple factors such as PCR equipment (even if it is the same model), extraction system, sample type, and pretreatment, among others.

Bibliography/Bibliografía












1. Bagnall, Paulette MPAS, PA-C; Rizzolo, Denise PA-C, PhD Bacterial vaginosis, JAAPA: December 2017 - Volume 30 - Issue 12 - p 15-21
2. Balashov SV, Mordechai E, Adelson ME, Gyax SE. Identification, quantification and subtyping of Gardnerella vaginalis in noncultured clinical vaginal samples by quantitative PCR. J Med Microbiol. 2014 Feb;63(Pt 2):162-175.
3. Bautista CT, Wurapa E, Sateren WB, Morris S, Hollingsworth B, Sanchez JL. Bacterial vaginosis: a synthesis of the literature on etiology, prevalence, risk factors, and relationship with chlamydia and gonorrhea infections. Mil Med Res. 2016 Feb 13;3:4.
4. Brown SE, Schwartz JA, Robinson CK, O'Hanlon DE, Bradford LL, He X, Mark KS, Bruno VM, Ravel J, Brotman RM. The Vaginal Microbiota and Behavioral Factors Associated With Genital Candida albicans Detection in Reproductive-Age Women. Sex Transm Dis. 2019 Nov;46(11):753-758.
5. Cassone A. (2014). Vulvovaginal Candida albicans infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology, 122(6), 785–794.
6. CDC - Trichomoniasis Statistics. Centers for Disease Control and Prevention, Centers for Disease Control and Prevention, 5 Apr. 2021, <https://www.cdc.gov/std/trichomonas/stats.htm>.
7. Coudray MS, Madhivanan P. Bacterial vaginosis-A brief synopsis of the literature. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2020 Feb;245:143-148.
8. Edwards, T., Burke, P., Smalley, H., & Hobbs, G. (2014). Trichomonas vaginalis: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. Critical Reviews in Microbiology, 42(3), 406–417.
9. Gardner HL, Dukes CD. Haemophilus vaginalis vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. Am J Obstet Gynecol. 1955;69(5):962–76.
10. Makanjuola O, Bongomin F, Fayemiwo SA. An Update on the Roles of Non-albicansCandida Species in Vulvovaginitis. J Fungi (Basel). 2018 Oct 31;4(4):121.
11. Morrill S, Gilbert NM, Lewis AL. Gardnerella vaginalis as a Cause of Bacterial Vaginosis: Appraisal of the Evidence From in vivo Models. Front Cell Infect Microbiol. 2020 Apr 24;10:168.
12. Noh CS, Kim SS, Park SY, Moon HS, Hong Y, Ryu JS. Comparison of Two PCR Assays for Trichomonas vaginalis. Korean J Parasitol. 2019 Feb;57(1):27-31.
13. Peebles, Kathryn; Velloza, Jennifer MPH; Balkus, Jennifer E., McClelland, R. Scott; Barnabas, Ruanne V. MBChB. High Global Burden and Costs of Bacterial Vaginosis: A Systematic Review and Meta-Analysis, Sexually Transmitted Diseases: May 2019 - Volume 46 - Issue 5 - p 304-311
14. Potter RF, Burnham CD, Dantas G. In Silico Analysis of Gardnerella Genomespecies Detected in the Setting of Bacterial Vaginosis. Clin Chem. 2019 Nov;65(11):1375-1387.
15. Singh, R., Ramsuran, V., Mitchev, N. et al. Assessing a diagnosis tool for bacterial vaginosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 39, 1481–1485 (2020).

Trademarks/Marcas registradas

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

Todas las marcas comerciales que puedan aparecer en este prospecto pertenecen a sus respectivos propietarios.

Symbols for components and reagents / Símbolos para reactivos y productos

	<i>In vitro</i> diagnostic device <i>Producto para diagnóstico in vitro</i>		Contains sufficient for <n> test <i>Contiene <n> test</i>		Catalogue number <i>Número de referencia</i>		Keep dry <i>Almacenar en lugar seco</i>		Manufacturer <i>Fabricante</i>
	Consult instructions for use <i>Consultar las instrucciones de uso</i>		Batch code (yyyy-xxx) <i>Número de lote (yyyy-xxx)</i>		Use by (yyyy-mm-dd: year-month-day) <i>Fecha de caducidad (yyyy-mm-dd: año-mes-día)</i>		Temperature limitation <i>Limitación de temperatura</i>		Volume <i>Volumen</i>
	CE marking <i>Marcado CE</i>								

Change Control / <i>Control de cambios</i>		
Version Nº / <i>Versión Nº</i>	Changes / <i>Cambios</i>	Date / <i>Fecha</i>
00	Original versión / <i>Versión original</i>	27/08/2020
01	New format, editorial improvement and better explanation of some sections, more information regarding material, reagents, transport and conservation, bibliographic information update, addition of some precautions, recommendations, clarifications and limitations, update with follow-up evaluations, deletion of Attached I and II, addition of symbols not covered / <i>Nuevo formato, mejora editorial y mejor explicación de algunas secciones, más información sobre el material, los reactivos, el transporte y la conservación, actualización de la información bibliográfica, adición de algunas precauciones, recomendaciones, aclaraciones y limitaciones, actualización con evaluaciones de seguimiento, supresión de los Anexos I y II y adición de símbolos no contemplados.</i>	24/04/2024

Real-Time PCR Kits



VA Vitassay

identifying pathogens worldwide

Vitassay Healthcare, S.L.U

Parque Tecnológico Walqa

Ctra. N-330 Km. 566

22197 Huesca (Spain)

Ph. (+34) 974 001 193

info@vitassay.com

www.vitassay.com

F09-81 Rev.00