



STD Panel Strip

Test para la detección de 10 patógenos asociados a enfermedades de transmisión sexual

Test for the detection of 10 pathogens associated to sexually transmitted diseases

Test per il rilevamento di 10 patogeni associati con malattie sessualmente trasmissibili



OPERON, S.A. - Camino del Plano, 19 - E-50410 Cuarte de Huerva - (Zaragoza) – ESPAÑA

ES

STD Panel Strip

Test para la detección de 10 patógenos asociados con enfermedades de transmisión sexual.

FINALIDAD PREVISTA

El test STD Panel Strip es un test basado en la técnica del blot reverso que permite la detección cualitativa de 10 patógenos asociados a enfermedades de transmisión sexual: *Chlamydia trachomatis* (distinguiendo las variantes L1, L2 y L3 que provocan linfogranuloma venereo, LGV), *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Herpes simplex 1*, *Herpes simplex 2*, y *Treponema pallidum*.

Mediante análisis comparativo de las secuencias descritas usando BLAST y el programa BioEdit se ha verificado la detección de los distintos serotipos/secuencias genéticas descritas para cada uno de los patógenos detectados con el kit. Así, se detectan todos los serotipos de *Chlamydia trachomatis* (A, B, B_α, C, D, D_α, E, F, G, H, I, I_α, J, J_α, K, L₁, L₂ y L₃) y todas las serovariantes de *Ureaplasma spp* (1-14).

El producto puede utilizarse para cualquier indicación que implique la identificación de los patógenos mencionados: diagnóstico inicial, screening, monitorización.

Para el diagnóstico final deben tenerse también en cuenta otros parámetros como los síntomas mostrados y el historial clínico del paciente.

FUNDAMENTO

El kit STD Panel Strip se basa en el principio de la hibridación reversa, y permite la detección e identificación en muestras de ADN de 10 patógenos asociados a enfermedades de transmisión sexual.

En la actualidad, las enfermedades de transmisión sexual (ETS o STDs) conforman el grupo más frecuente de enfermedades infecciosas de declaración obligatoria en la mayoría de los países del mundo. Su incidencia es elevada y se conocen más de 20 microorganismos patógenos que se transmiten por contacto sexual, siendo los más frecuentes *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* y *Mycoplasma (genitalium y hominis)*.

La mayoría de las ETS tienen tratamiento y son curables. Afectan tanto a hombres como a mujeres, siendo en 2/3 de los casos menores de 25 años. Se pueden tener sin que aparezca ningún tipo de síntoma, sobre todo en el caso de las mujeres, pero la enfermedad no se cura si no se recibe el tratamiento adecuado. Si no se tratan, pueden ocasionar graves trastornos de salud como esterilidad, ceguera, desórdenes mentales, defectos físicos de nacimiento, aumento de las probabilidades de desarrollar un cáncer, enfermedades cardíacas e incluso la muerte. En función de la enfermedad, la infección puede transmitirse a través de cualquier tipo de actividad que involucre los órganos sexuales; también puede transmitirse por contacto con la sangre durante la actividad sexual.

La tendencia actual de incremento permanente de las enfermedades de transmisión sexual, sobre todo entre los jóvenes menores de 25 años, hace que su diagnóstico precoz y certero sea de gran interés.

El procedimiento del kit STD Panel Strip consta de tres pasos: a) extracción de ADN, b) amplificación mediante PCR y c) hibridación/revelado.

a) Extracción de ADN

Reactivos no incluidos en el kit.
Ver apartado "Muestras".

b) Amplificación mediante PCR

El kit STD Panel Strip incluye los reactivos necesarios para realizar la amplificación de secuencias genéticas específicas de los patógenos que se detectan con el kit. Los genes empleados en cada caso se muestran en la siguiente tabla:

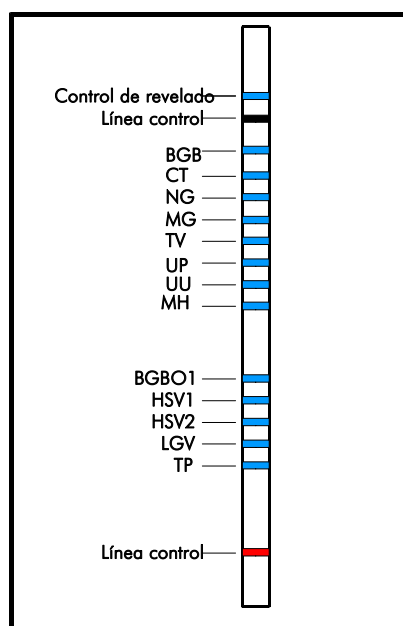
| Patógeno | Gen / Locus | Patógeno | Gen / Locus |
|-----------------------|-------------------|------------------------------------|------------------|
| <i>C. trachomatis</i> | Omp | Herpes virus | DNA polimerasa |
| | Plásmido críptico | <i>C. trachomatis</i> (L1, L2, L3) | pmpH |
| <i>T. vaginalis</i> | TRIDNATARP | <i>T. pallidum</i> | DNA polimerasa I |
| <i>M. genitalium</i> | MgPA 190 | Gen control B | β -globina |
| <i>Ureaplasmas</i> | Ureasa (Ure B) | | |
| <i>M. hominis</i> | gap | | |
| <i>N. gonorrhoeae</i> | Opa | | |
| | Por A | | |
| Gen control A | β -globina | | |

Durante la PCR se produce también la amplificación de dos regiones de un gen control humano (β -globina).

c) Hibridación y revelado

En esta etapa se produce la unión específica de los fragmentos de ADN amplificados durante la PCR a una serie de sondas depositadas sobre unas membranas de nylon.

Las membranas llevan unidas de forma covalente sondas específicas para cada uno de los microorganismos detectados, además de sondas para las dos regiones del gen control (BGB y BGBO1), una sonda control del revelado y dos líneas, una negra y una roja, para el control de la posición de la tira y como ayuda en la interpretación de los resultados (ver dibujo adjunto).



MATERIALES INCLUIDOS EN EL KIT

| STD Panel Strip | | | Kit 16 tests | Kit 48 tests |
|------------------------------|-----------------------------|--------------|------------------|------------------|
| | Membranas | STRIPS | 16 tiras | 48 tiras |
| | Cubetas 8 canales | PL | 2 | -- |
| Reactivos de PCR REAG PCR | Premezcla PCR | REAG PCR MIX | 2 x 0,80 ml | 3 x 1,40 ml |
| | Primers | REAG PRIMER | 0,110 + 0,110 ml | 0,275 + 0,275 ml |
| | Taq | REAG TAQ HS | 0,050 ml | 0,120 ml |
| | Desnaturalizante | SOLN DN | 1 ml | 2 x 1 ml |
| | Tampón de hibridación | BUF HYB | 60 ml | 125 ml |
| | Tampón de lavado 1 | BUF WASH 1 | 100 ml | 250 ml |
| | Conjugado | CONJ HRP | 60 ml | 125 ml |
| | Tampón de lavado 2 | BUF WASH 2 | 130 ml | 350 ml |
| | Substrato | SUBS TMB | 30 ml | 65 ml |
| | Instrucciones de uso | | 1 | 1 |
| | Plantilla de interpretación | | 1 | 1 |

MATERIALES NO INCLUIDOS EN EL KIT

Para el desarrollo del kit se requieren, además, los siguientes materiales:

1. Microtubos para PCR.
2. Micropipetas y puntas para micropipetas (estériles o irradiadas con UV e, idealmente, con filtro).
3. Pinzas y lápiz (opcional).
4. Cronómetro.
5. Termómetro.

EQUIPOS NECESARIOS PARA EL DESARROLLO DEL KIT

1. Termociclador
Se han probado con éxito los siguientes termocicladores: 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems), MJ Mini Gradient Thermal Cycler (BioRad), Mastercycler Personal (Eppendorf), S1000 Thermal Cycler (BioRad).
2. Termoagitador para placas
El kit ha sido validado con los termoagitadores: PST-60HL (Biosan S.L.), Profiblot T30 y T48 (Tecan), Autoblot 3000H (medTEC), TENDIGO (Fujirebio), Dynablot Heat (Dynex).
3. Escáner BLOTrix S1 o BLOTrix R2 (BioSciTec, opcional).

PRECAUCIONES

1. Utilizar todos los reactivos únicamente *in vitro*.
2. Seguir rigurosamente las instrucciones indicadas. La modificación de cualquiera de los **pasos o temperaturas** puede afectar gravemente a los resultados del test.
3. Es esencial que todos los materiales que se vayan a usar estén libres de DNAsas. Se recomienda usar puntas de pipeta con filtro en la preparación de PCRs, para evitar problemas de contaminación por formación de aerosoles. Siga todas las precauciones normales para la preparación de las amplificaciones. Utilice material autoclavado para el proceso de hibridación/revelado.
4. Almacenar los componentes del kit en las condiciones indicadas.
5. No intercambiar los componentes de kits con distinto número de lote.

6. No usar los componentes del kit después de las fechas de caducidad.
7. Las tiras reactivas son de un único uso.
8. Las cubetas proporcionadas son de un único uso.
9. Cada canal de la cubeta es para una única tira.
10. En caso de rotura del envase, el producto puede ser utilizado si ninguno de los componentes ha sido dañado.
11. El producto usado debe desecharse conforme a la legislación vigente.
12. Las muestras de pacientes deben considerarse siempre como potencialmente infecciosas. Observe todas las normas medioambientales y de seguridad.
13. Es aconsejable que la tira, una vez utilizada se manipule teniendo las mismas consideraciones que con la muestra. Se recomienda gestionarla como material potencialmente peligroso.
14. La solución de desnaturalización contiene < 2 % de NaOH y es irritante para ojos y piel (H314 y P280, P305, P351, P338, P310).
15. No tirar la caja externa del kit hasta que se haya utilizado todo el contenido. La caja contiene información esencial respecto al marcado CE del producto y lotificación.

ALMACENAMIENTO

Almacenar todos los reactivos a 2-8 °C. Debido al almacenamiento a 2-8 °C puede observarse la aparición de precipitados en alguna de las soluciones (tampón de hibridación, tampones de lavado 1 y 2, conjugado). Estos precipitados se redisuelven al atemperar (conjugado) o calentar a 42 °C (tampón de hibridación y tampones de lavado 1 y 2).

La fecha de caducidad de todos los reactivos está impresa en la etiqueta.

MUESTRAS

El test ha sido diseñado y validado para su uso con ADN obtenido de frotis de diversos orígenes (uretral, endocervical, rectal, vaginal) y de orinas.

En el caso de frotis, utilizar una torunda de algodón o cepillo secos y estériles para la toma de muestra. Asegúrese de tomar una cantidad suficiente de muestra, pero sin que se produzca el sangrado. Guardar la torunda en un tubo con un medio de transporte adecuado (por ejemplo, medio Amies-Stuart o Cobas PCR Female Swab Sample Packet de Roche Molecular Systems).

En el caso de muestras de orina, se debe pedir al paciente que recoja los primeros 10-20 ml de orina en un tubo estéril, habiéndose abstenido de orinar durante al menos dos horas antes de la toma de la muestra.

La calidad y concentración del ADN extraído es de vital importancia para el correcto funcionamiento del kit. La presencia de inhibidores en la muestra o la baja concentración de ADN podría reducir la sensibilidad del test.

Algunos de los procedimientos de extracción de ADN que han sido evaluados con resultados satisfactorios con el kit STD Panel Strip son:

- a) Extracción manual de ADN con resinas de sílice: QIAamp DNA Mini Kit (se recomienda seguir el procedimiento descrito para virus) o MinElute Virus Spin Kit (Qiagen).
En el caso de torundas secas, resuspender el contenido de la torunda con 200 – 1000 µl de tampón fosfato (PBS) y continúe con la extracción.
Con QIAamp DNA Mini Kit: se recomienda extraer 200 µl de frotis y eluir con 100 µl de tampón TE o tampón de elución.
Con MinElute Virus Spin Kit: se recomienda extraer 200 µl de frotis y eluir con 20-50 µl de tampón TE o tampón de elución.
- b) Extracción de ADN con plataforma COBAS 4800 (Roche Diagnostics): seguir las instrucciones del fabricante.
- c) Extracción de ADN con plataforma QiaCube (Qiagen): seguir las instrucciones del fabricante.

Almacenar las muestras de ADN a 2-8 °C, si se van a analizar en un tiempo breve, o a -20 °C para almacenamientos más prolongados.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Los especímenes cervicales pueden contener sustancias interferentes que se sabe inhiben las reacciones de PCR. Estas sustancias incluyen, entre otras: sangre (humana), leucocitos y productos anticonceptivos y de higiene femenina como los geles anticonceptivos, cremas anti-fúngica, espermicidas, lubricantes vaginales, etc.

La mayoría de estas sustancias interferentes serán eliminadas durante la extracción del ADN. En el caso de que en el ADN final quedase algún inhibidor, este sería detectado por la ausencia de amplificación de los genes control durante la PCR.

PROCEDIMIENTO STD PANEL STRIP

1.- Reacción en cadena de la polimerasa

Preparación de PCRs

Importante: antes de abrir los viales con los reactivos de PCR centrifugarlos brevemente. De este modo se asegurará de que todo el contenido de los mismos esté en el fondo del tubo.

Para cada muestra se harán dos reacciones de amplificación: una con los primers A (vial con tapón azul) y otra con los primers B (vial con tapón blanco). Los reactivos Premezcla de PCR y Taq son comunes a ambas reacciones.

- Preparar los tubos de PCR necesarios según el número de ADNs que se vayan a amplificar (dos por muestra).
- En cada tubo de PCR añadir: 39 μ l de premezcla de PCR + 5 μ l de primers (A o B) + 1 μ l de Taq + 5 μ l de ADN. Mezclar. Si es posible, mantener todos los reactivos a 2-8 °C durante la preparación.

Si se van a amplificar varios ADNs se recomienda preparar una mezcla común con todos los reactivos, de modo que finalmente se añadan 45 μ l de mezcla + 5 μ l de ADN. Por ejemplo:

| Nº de PCRs | Premezcla PCR | Primers | Taq |
|------------|---------------|--------------|-------------|
| 1 | 39 μ l | 5 μ l | 1 μ l |
| 3 | 136,5 μ l | 17,5 μ l | 3,5 μ l |
| 5 | 214,5 μ l | 27,5 μ l | 5,5 μ l |
| 8 | 351 μ l | 45 μ l | 9 μ l |

- Las mezclas con todos los reactivos para la PCR deben prepararse siempre en exceso, para contrarrestar las pérdidas de volumen que se producen durante el proceso de pipeteo.

Siguiendo las buenas prácticas de laboratorio, el usuario debería amplificar también un control negativo (agua o tampón TE, por ejemplo) y, si fuera necesario, un control positivo (no incluido en el kit).

Amplificación

Debe tenerse en cuenta la importancia de conseguir una adecuada concentración de ADN para obtener los resultados esperados.

Introducir los tubos en el aparato de PCR (si se requiere, añadir 1 gota de aceite Nujol sobre cada reacción de PCR) y amplificar el ADN con el siguiente programa:

94 °C, 5 min
40 ciclos de: 94 °C, 15 seg
57 °C, 1 min 30 seg
72 °C, 45 seg
72 °C, 5 min
4 °C

→ Ver esquema de preparación de PCR en Anexo al documento

Una vez terminada la PCR continuar con el desarrollo de la tira. Si las muestras no se van a analizar en el momento, almacenarlas a 2-8 °C durante no más de 24 h. Para almacenamientos más prolongados, congelar a -20 °C.

2.- Desarrollo de la tira

Bajo petición, Operon facilitará al usuario el procedimiento de trabajo según el instrumento que se vaya a utilizar para el desarrollo de las tiras (PST-60HL, Profiblot, Autoblot 3000H, TENDIGO o Dynablot Heat). Alternativamente, puede consultarlo en la siguiente dirección web:

<https://operon.es/es/products-protocols/>

Para el análisis de cada muestra, mezclar el mismo volumen de la PCR A y B (por ejemplo, 15 μ l + 15 μ l) y continuar con el desarrollo del procedimiento en función del instrumento que se vaya a utilizar. En el paso de desnaturalización, se dispensarán en la placa **25 μ l de desnaturalizante + 25 μ l de la mezcla de PCRs**.

El producto se ha probado utilizando diferentes plataformas de trabajo. A modo informativo se especifican los nombres comerciales de las plataformas de trabajo utilizadas, lo que no implica un uso exclusivo y dependiente de dichas marcas comerciales, sino que se refieren de forma representativa al modo de trabajo utilizado. El producto funciona correctamente mientras se utilice una plataforma que asegure el programa de temperatura planteado para el producto.

3.- Interpretación de la tira

La interpretación de las tiras puede hacerse de manera visual, con ayuda de la plantilla incluida en el kit (ver procedimientos de trabajo para cada instrumento) o de forma automática, mediante el uso de los escáneres BLOTrix R2 o BLOTrix S1 (BioSciTec).

Bajo petición, OPERON, S.A., S.A. facilitará al usuario las instrucciones para la interpretación automática de las tiras mediante escáner (DO-09053004 "Instrucciones de uso BLOTrix R2_S1"). Alternativamente, puede consultarlo en la siguiente dirección web:

<https://operon.es/es/products-protocols/>

Importante: la interpretación automática de los resultados requiere siempre de una verificación visual de las tiras; bandas muy débiles podrían no ser detectadas por el instrumento.

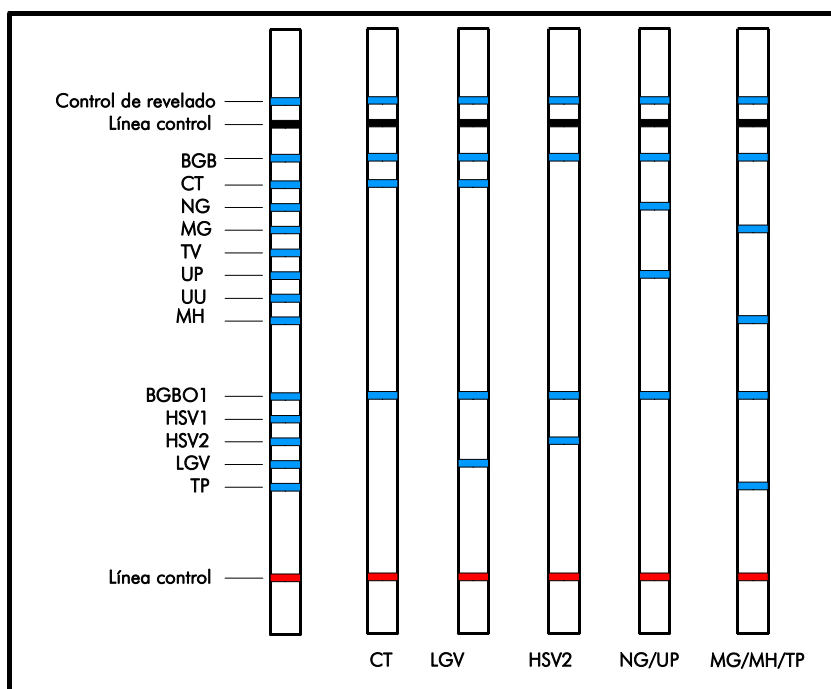
RESULTADOS

El kit STD Panel Strip permite la detección e identificación de 10 patógenos asociados a enfermedades de transmisión sexual: *Chlamydia trachomatis* (CT) y sus variantes L1, L2 y L3 causantes de linfogranuloma venéreo (LGV), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Mycoplasma genitalium* (MG), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Ureaplasma parvum* (UP), *Ureaplasma urealyticum* (UU), *Mycoplasma hominis* (MH), *Herpes simplex 1* (HSV1), *Herpes simplex 2* (HSV2), y *Treponema pallidum* (TP).

Una muestra de ADN podrá dar como resultado:

- Sólo las bandas correspondientes a los genes control (BGB y BGBO1): ninguno de los patógenos detectados con el kit está presente en la muestra.
- Las bandas control y una banda asociada a un patógeno determinado: muestra positiva para ese determinado patógeno.
- Las bandas control y varias bandas asociadas a diversos patógenos: muestra positiva con infección múltiple.
- Una o varias bandas asociadas a patógenos pero sin una o las dos bandas control: muestra positiva para ese/esos patógenos en la que el/los genes control no amplifican. Esto puede suceder, por ejemplo, cuando la muestra presenta un elevado número de copias de uno o varios patógenos, ya que las condiciones de PCR se han diseñado para favorecer la amplificación del ADN de dichos patógenos frente a la de los controles internos.

Ejemplos de genotipado utilizando las tiras STD Panel Strip



Atención: en el caso de Linfogramuloma venéreo (LGV), al tratarse de una variante de *Chlamydia trachomatis*, aparecerán las bandas asociadas a *C. trachomatis* junto con las de LGV.

CONTROL DE CALIDAD

La línea control de revelado debe aparecer siempre por encima de la línea negra superior. Su ausencia será indicativa de problemas en la fase de hibridación/revelado del producto.

La tira correspondiente al control de amplificación negativa mostrará únicamente la línea de control de revelado.

En el caso de muestras negativas, es necesaria la presencia de las bandas asociadas al control interno (BGB y BGBO1) para confirmar que se trata de un verdadero negativo. La ausencia de esta banda en una muestra negativa es indicativa de ausencia de amplificación durante la PCR, lo que puede estar causado por falta de ADN (medir concentración), por su degradación o por la presencia de inhibidores de la PCR en el mismo (hemoglobina, restos de sales, etc).

PRESTACIONES / EVALUACIONES INTERNAS Y EXTERNAS

La utilización de este test está limitada a profesionales cualificados y familiarizados con métodos de Biología Molecular.

Se ha evaluado el test con numerosas muestras de ADN de diferente origen en varias evaluaciones que se muestran a continuación. Las 10 primeras evaluaciones se llevaron a cabo en las instalaciones de OPERON, S.A., mientras que la evaluación nº 11 tuvo lugar en las instalaciones del Centro de Análisis Genéticos (CITOGEN, Zaragoza, España). Todos los kits comerciales utilizados disponían de marcado CE.

Evaluación nº 1

Se analizaron la sensibilidad y especificidad de detección de *Trichomonas vaginalis* con 77 muestras de ADN extraídas de frotis cervico-vaginales previamente evaluados mediante análisis en fresco con microscopía óptica y confirmación con cultivo en medio específico (Dpto. Microbiología, Hospital Universitario de Zaragoza). La extracción de las muestras de ADN se realizó con el DNA Mini Kit, (Qiagen).

La concordancia de sensibilidad y especificidad entre los métodos fue del 100 % y del 94,4 %, respectivamente. De las 18 muestras negativas por microscopía/cultivo, una dio resultado positivo con el kit STD Panel Strip; dicho positivo se confirmó mediante el análisis por PCR de dos zonas génicas alternativas del protozoo.

Evaluación nº 2

Se analizaron la sensibilidad y especificidad de detección de *Chlamydia trachomatis*, serotipos L1, L2 y L3 causantes de *Linfogranuloma venereum*. Para la sensibilidad, se emplearon 10 muestras de ADN previamente evaluadas por PCR Real Time (procedimientos de rutina del Hospital Miguel Servet en Zaragoza, Hospital Universitario de Donostia en San Sebastián y Hospital Valme en Sevilla). Para la especificidad se emplearon 13 muestras de ADN extraídas con el sistema Qiacube de Qiagen y evaluadas con el kit RealCycler THLV (Progenie).

La concordancia de sensibilidad y especificidad obtenida entre los métodos fue del 100 %.

Evaluación nº 3

Se analizaron la sensibilidad y especificidad de detección de *Treponema pallidum* con 13 muestras de ADN (2 positivas y 11 negativas), extraídas con el sistema Qiacube de Qiagen y evaluadas con el kit RealCycler THLV (Progenie).

La concordancia de sensibilidad y especificidad obtenida entre los métodos fue del 100 %.

Evaluación nº 4

Se analizaron la sensibilidad y especificidad de detección de HSV1 con 24 muestras de ADN (15 positivas y 9 negativas), extraídas con el sistema Qiacube de Qiagen y analizadas con el kit Fluorotype HSV (Hain).

La concordancia de sensibilidad y especificidad obtenida entre los métodos fue del 100 %.

Por otro lado, se analizaron la sensibilidad y especificidad de detección de HSV1 con 68 muestras (28 positivas y 40 negativas) extraídas con la Plataforma COBAS 4800 y analizadas con el kit LightCycler HSV1/2 Qual kit (Roche).

La concordancia de sensibilidad y especificidad obtenida entre los métodos fue del 96,4 y 100 %, respectivamente. Se encontró un único falso negativo con el kit STD Panel Strip que se correspondía con una muestra con un Ct de 40 con el kit LightCycler HSV1/2 (Roche).

Evaluación nº 5

Se analizaron la sensibilidad y especificidad de detección de HSV2 con 24 muestras de ADN (9 positivas y 15 negativas), extraídas con el sistema Qiacube de Qiagen y analizadas con el kit Fluorotype HSV (Hain).

La concordancia de sensibilidad y especificidad obtenida entre los métodos fue del 88,9 y 100 %, respectivamente. Una muestra positiva dio resultado negativo en HSV2 con el kit STD Panel Strip, pero positivo en *Treponema pallidum* (confirmado con el kit RealCycler THLV de Progenie).

Por otro lado, se analizaron la sensibilidad y especificidad de detección de HSV1 con 68 muestras (40 positivas y 28 negativas) extraídas con la Plataforma COBAS 4800 y analizadas con el kit LightCycler HSV1/2 Qual kit (Roche).

La concordancia de sensibilidad y especificidad obtenida entre los métodos fue del 97,5 y 100 %, respectivamente. Se encontró un único falso negativo con el kit STD Panel Strip que se correspondía con una muestra con un Ct de 42,5 con el kit LightCycler HSV1/2 (Roche).

Evaluación nº 6

Se analizaron la sensibilidad y especificidad de detección de *Chlamydia trachomatis* con 197 muestras de ADN (55 positivas y 142 negativas), extraídas con el sistema Qiacube de Qiagen y analizadas con el kit Dx CT/NG/MG Assay (BioRad).

La concordancia de sensibilidad y especificidad obtenida entre los métodos fue del 100 y 99,3 %, respectivamente. Una muestra negativa dio resultado positivo en CT con el kit STD Panel Strip.

Por otro lado, se analizó la sensibilidad de detección de *Chlamydia trachomatis* con 50 muestras positivas, extraídas con la Plataforma COBAS 4800 y analizadas con el kit CT/NG Cobas 4800 (Roche).

La concordancia de sensibilidad obtenida entre los métodos fue del 100 %.

Evaluación n° 7

Se analizaron la sensibilidad y especificidad de detección de *Neisseria gonorrhoeae* con 193 muestras de ADN (76 positivas y 117 negativas), extraídas con el sistema Qiacube de Qiagen y analizadas con el kit Dx CT/NG/MG Assay (BioRad).

La concordancia de sensibilidad y especificidad obtenida entre los métodos fue del 98,7 y 100 %, respectivamente. Una muestra positiva dio resultado negativo en NG con el kit STD Panel Strip; la muestra también resultó negativa con el kit NG OligoGen (Operon).

Por otro lado, se analizó la sensibilidad de detección de *Chlamydia trachomatis* con 50 muestras positivas, extraídas con la Plataforma COBAS 4800 y analizadas con el kit CT/NG Cobas 4800 (Roche).

La concordancia de sensibilidad obtenida entre los métodos fue del 100 %.

Evaluación n° 8

Se analizaron la sensibilidad y especificidad de detección de *Mycoplasma genitalium* con 193 muestras de ADN (86 positivas y 107 negativas), extraídas con el sistema Qiacube de Qiagen y analizadas con el kit Dx CT/NG/MG Assay (BioRad).

La concordancia de sensibilidad y especificidad obtenida entre los métodos fue del 94,2 y 100 %, respectivamente.

Evaluación n° 9

Se analizó la sensibilidad de detección de *Ureaplasma spp* (*Ureaplasma parvum* + *Ureaplasma urealyticum*) con 31 muestras de frotis de exudados cervico-vaginales conservadas en medio Amies-Stuart. Dichas muestras habían sido analizadas previamente con el kit Mycoplasma IST 2 (BioMerieux), resultando 30 positivas y 1 negativa. La extracción del ADN de los frotis se realizó con el kit DNA Mini Kit (Qiagen).

La concordancia de sensibilidad obtenida entre los métodos fue del 96,7 %. Una de las muestras positivas con el kit Mycoplasma IST 2 resultó negativa para *Ureaplasma* con el kit STD Panel Strip, pero positiva para *Mycoplasma hominis*. El análisis de la muestra con tres PCRs individuales que tienen como diana diferentes regiones del gen de la ureasa dio también resultado negativo para *Ureaplasma*.

La única muestra negativa del estudio dio resultado positivo con el kit STD Panel Strip. No aplica evaluar la concordancia de especificidad al haber en el estudio solo una muestra negativa, pero es importante señalar que el kit Mycoplasma IST 2 solo da señal positiva para contajes superiores a 1000 UCC/ml, mientras que STD Panel Strip no tiene esa limitación. La muestra positiva se confirmó con PCRs individuales de tres regiones diferentes del gen de la ureasa de *Ureaplasma*.

Por otro lado, se analizó la sensibilidad y especificidad de detección de *Ureaplasma spp* (*Ureaplasma parvum* + *Ureaplasma urealyticum*) con 64 muestras de frotis de exudados cervico-vaginales conservadas en medio Amies-Stuart. Dichas muestras habían sido analizadas previamente con el kit Mycoview (Zeacon Diagnostics), resultando 49 positivas y 15 negativas. La extracción del ADN de los frotis se realizó con el kit DNA Mini Kit (Qiagen).

La concordancia de sensibilidad y especificidad obtenida entre los métodos fue del 92 y 73,3 %, respectivamente. Tres de las muestras positivas con el kit Mycoview resultaron negativas para *Ureaplasma* con el kit STD Panel Strip. El análisis de dichas muestras con tres PCRs individuales que tienen como diana diferentes regiones del gen de la ureasa dio también resultado negativo para *Ureaplasma* en todos los casos.

De entre las 15 muestras negativas del estudio, cuatro dieron resultado positivo con el kit STD Panel Strip. Las cuatro muestras positivas se confirmaron con PCRs individuales de tres regiones diferentes del gen de la ureasa de *Ureaplasma*. Hay que señalar que el kit Mycoview, al igual que el kit Mycoplasma

IST2, solo da señal positiva para contajes superiores a 1000 UCC/ml, mientras que STD Panel Strip no tiene esa limitación.

Evaluación n° 10

Se analizó la sensibilidad y especificidad de detección de *Mycoplasma hominis* con 32 muestras de frotis de exudados cervico-vaginales conservadas en medio Amies-Stuart. Dichas muestras habían sido analizadas previamente con el kit Mycoplasma IST 2 (BioMerieux), resultando 2 positivas y 30 negativas. La extracción del ADN de los frotis se realizó con el kit DNA Mini Kit (Qiagen).

La concordancia de sensibilidad y especificidad obtenida entre los métodos fue del 50 y 70 %, respectivamente. De las dos muestras positivas con el kit Mycoplasma IST 2, una resultó negativa con STD Panel Strip, pero positiva para *Ureaplasma parvum*. Dicho positivo se confirmó con PCRs individuales de tres regiones diferentes del gen de la ureasa de *Ureaplasma*. De las 30 muestras negativas, 9 resultaron positivas para *Mycoplasma hominis* con el kit STD Panel Strip. Las 9 muestras se confirmaron como positivas con una PCR individual alternativa para *Mycoplasma hominis* e hibridación a sonda específica. Al igual que en el caso de *Ureaplasma spp*, el kit Mycoplasma IST 2 solo da señal positiva en *Mycoplasma hominis* para contajes superiores a 1000 UCC/ml.

Por otro lado, se analizó la sensibilidad y especificidad de detección de *Mycoplasma hominis* con 64 muestras de frotis de exudados cervico-vaginales conservadas en medio Amies-Stuart. Dichas muestras habían sido analizadas previamente con el kit Mycoview (Zeacon Diagnostics), resultando 19 positivas y 45 negativas. La extracción del ADN de los frotis se realizó con el kit DNA Mini Kit (Qiagen).

La concordancia de sensibilidad y especificidad obtenida entre los métodos fue del 57,9 y 97,8 %, respectivamente. De las 19 muestras positivas con el kit Mycoview, 8 resultaron negativas con STD Panel Strip; todas ellas dieron resultados positivo para *Ureaplasma*. Dichos negativos se confirmaron con una PCR alternativa para *M. hominis*; a su vez, la positividad en *Ureaplasma* se confirmó con PCRs individuales de tres regiones diferentes del gen de la ureasa de *Ureaplasma spp*. De entre las 45 muestras negativas, una resultó positiva para *Mycoplasma hominis* con STD Panel Strip; dicha muestra se confirmó con una PCR individual alternativa para *Mycoplasma hominis* e hibridación a sondas específicas. Al igual que en el caso del kit Mycoplasma IST2, Mycoview solo da resultado positivo en *M. hominis* para contajes superiores a 1000 UCC/ml.

La concordancia de sensibilidad en *M. hominis* comparando con Mycoplasma IST2 (50 %) o Mycoview (57,9 %) es muy baja. Estos kits aprovechan las propiedades bioquímicas de los *Ureaplasmas* y *Mycoplasmas* y se basan en la observación de un cambio en el color del medio de amarillo a púrpura en caso de que se produzca la metabolización de la urea (*Ureaplasmas spp*) o de la arginina (*Mycoplasma hominis*).

Existen publicaciones en las que se indica que estos tests tienen un problema de falsa positividad, sobre todo en *M. hominis*. En uno de ellos (Biernat-Sudolska M.) se hace un análisis de un total de 5715 muestras, de ellas 240 dan un resultado positivo para *M. hominis*, confirmándose como falsos positivos un total de 176. En todos los casos, se demostró la presencia de ureaplasmas con un título >10000 CFU/ml (al igual que sucede en nuestro estudio).

Evaluación n° 11

Se comparó la sensibilidad y especificidad de detección de los diferentes microorganismos detectados con STD Panel Strip con la de los kits CLART Panel STIsA/STIsB (Genomica). Para ello, se evaluaron con ambos kits un total de 81 muestras de ADN aisladas de frotis de diferente origen (endocervical, vaginal, uretral, faríngeo, rectal) mediante el kit DNA Mini Kit (Qiagen). Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

| Concordancia final por microorganismo entre los métodos | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------------------------|------|------|-----|-----|------|------|------|------|------|------|-----|
| | CT | NG | MG | TV | UP | UU | MH | HSV1 | HSV2 | LGV | TP |
| Sensibilidad | 100 | 94,1 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | NA | 100 |
| Especificidad | 96,8 | 100 | 100 | 100 | 89,6 | 88,6 | 95,9 | 100 | 98,5 | 98,8 | 100 |

Todas las muestras discordantes se confirmaron a favor del kit STD Panel Strip.

POSIBLES PROBLEMAS

1. No aparece ninguna banda en la tira, incluida la banda control.

- No se han equilibrado a temperatura ambiente el conjugado y/o revelador.
- No se ha añadido el conjugado y/o revelador, o se han añadido en poca cantidad.

2. Sólo aparece la línea de la sonda control.

- Fallo de amplificación de la PCR (comprobar en gel de agarosa).
- No se ha añadido la PCR, o se ha añadido en menor cantidad, en el paso de hibridación.
- Temperatura incorrecta del tampón de hibridación/lavado 1 (superior a la indicada).
- Temperatura incorrecta del incubador (superior a la indicada).

3. Fuerte color de fondo en la tira tras el revelado.

- Los pasos de lavado no se realizaron de manera adecuada (tiempo inadecuado, cantidad de tampón menor, tampones fríos).

4. Tinción no homogénea de la tira.

- Agitación inadecuada (revisar la programación del termoagitador para placas).
- Las tiras no quedaron sumergidas por completo durante las incubaciones.

5. Resultados inesperados

- Temperatura de incubación y/o de los tampones/reactivos inadecuadas.
- Contaminación en las PCRs (comprobar con un control negativo).
- Contaminación de canales adyacentes por paso de líquido de un canal a otro al añadir el tampón de hibridación.

La temperatura idónea para la realización del proceso de hibridación revelado es de 42 °C. Entre 39 y 42 °C el test ha demostrado un funcionamiento similar, sin aparición de reacciones inespecíficas; temperaturas superiores a 43 °C pueden ocasionar una leve reducción en la intensidad de las bandas y en la sensibilidad del kit.

SENSIBILIDAD

Definimos como **límite de detección** del kit a la cantidad mínima de ADN/ARN que puede detectarse con el test.

Definimos como **límite del test** a la cantidad mínima de ADN/ARN con la que siempre podemos hacer el genotipado o que siempre detectamos con el test.

Ambos límites se han determinado para cada uno de los patógenos detectados con el kit STD Panel Strip (excepto *U. parvum*, cuyos límites serán semejantes a los de *U. urealyticum*). Para ello, se analizaron diluciones seriadas de ADNs de cada uno con tres lotes diferentes de producto.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

| | Límite de detección | Límite del test |
|----|---------------------|-----------------|
| CT | 1 copia | 3 copias |
| NG | 2 copias | 6 copias |
| MG | 0,00000128 ng | 0,000032 ng |
| TV | 1 copia | 3 copias |
| UU | 0,000032 ng | 0,00016 ng |
| MH | 0,000032 ng | 0,00016 ng |

| | Límite de detección | Límite del test |
|------|---------------------|-----------------|
| HSV1 | 6 copias | 12 copias |
| HSV2 | 2 copias | 6 copias |
| LGV | 12 copias | 12 copias |
| TP | 3 copias | 6 copias |

ESPECIFICIDAD

Mediante el análisis de numerosas muestras negativas, se ha descartado la presencia de reacción entrecruzada con la microbiota habitual del tracto urogenital. Entre estos microorganismos se encuentran: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Mycoplasma*, *Atopobium*, *Peptococcus*, *Petostreptococcus*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella*.

Por otro lado, se ha evaluado la especificidad del kit analizando ADNs de los microorganismos con mayor frecuencia asociadas a patogenia de región urogenital. Además, se ha incluido la bacteria *C. psittaci*, por su homología en la secuencia del gen *omp* con *C. trachomatis*.

Se ha comprobado la ausencia de reacción entrecruzada con:

| Microorganismo | Tipo | Cantidad en PCR | Resultado |
|---------------------------------------|----------------------------------------|-----------------|-------------------------------|
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | Cepa 434 ATCC, LGVII | 66500 copias | <i>C. trachomatis</i> |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | Aislado clínico | 72500 copias | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> |
| <i>Mycoplasma genitalium</i> | NCTC10195 | 0,5 ng | <i>Mycoplasma genitalium</i> |
| <i>Trichomonas vaginalis</i> | Aislado clínico | 74000 copias | <i>Trichomonas vaginalis</i> |
| <i>Ureaplasma urealyticum</i> | NCTC 010112 | 0,5 ng | <i>Ureaplasma urealyticum</i> |
| <i>Mycoplasma hominis</i> | NCTC 10111 | 0,5 ng | <i>Mycoplasma hominis</i> |
| <i>Herpes simplex 1</i> | Cepa MacIntyre | 90000 copias | <i>Herpes simplex 1</i> |
| <i>Herpes simplex 2</i> | Cepa MS | 80000 copias | <i>Herpes simplex 2</i> |
| <i>Treponema pallidum</i> | Cepa Nichols | 3500 copias | <i>Treponema pallidum</i> |
| <i>E.coli</i> | Cepa JM109 | 88 ng | Negativo |
| <i>Haemophilus ducreyi</i> | Cepa Tipo (NC10945) | 90 ng | Negativo |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | Cepa Stableforth G19 (CECT 183) | 27400 copias | Negativo |
| <i>Staphylococcus Aureus mecA (-)</i> | Subespecie Aureus (CECT 239) | 15 ng | Negativo |
| <i>Candida albicans</i> | Cepa NCPI 3152 (UKNCC) | 100 ng | Negativo |
| <i>Staphylococcus Aureus mecA (+)</i> | Subespecie Aureus (Nº 13661) | 95,6 ng | Negativo |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | Serotipo B. Cepa tipo NCTC 1026 | 37200 copias | Negativo |
| <i>Gardnerella vaginalis</i> | ATCC 14018 | 32400 copias | Negativo |
| <i>Chlamydophila psittaci</i> | Cepa 6 BC | 30000 copias | Negativo |
| HPV | 6, 11 | 5 ng | Negativo |
| HPV | 16, 18, 31, 39, 51, 53, 56, 58, 59, 82 | Muestra real | No reacción entrecruzada |

En el caso de *T. pallidum*, no se distingue *T. pallidum subs pallidum* (causante de la sífilis) de *T. pallidum subs pertenuae* y *T. paraluisuniculi*.

T. paraluisuniculi es una bacteria que infecta conejos y no hay descrita zoonosis.

T. pallidum subs pertenuae sí que infecta humanos, principalmente a menores de 15 años. Causa una enfermedad tropical conocida como pian, que afecta a la piel, los huesos y los cartílagos. No es una enfermedad de transmisión sexual, se transmite por contacto directo (de persona a persona), aunque no sexual, con el exudado de las lesiones de una persona infectada.

EFFECTO HOOK

Se han evaluado cantidades crecientes de ADN de cada uno de los microorganismos detectados con el kit sin que se haya observado inhibición de la señal o aparición de reacciones entrecruzadas que pudieran asociarse con la existencia de Efecto Hook.

No existe, por lo tanto, Efecto Hook.

PRECISIÓN INTRAENSAYO

Se ha estudiado la precisión intraensayo de STD Panel Strip mediante el análisis de, por un lado, 5 curvas de sensibilidad (diluciones de un ADN control compuesto por una mezcla de ADNs de todos los patógenos detectados en el kit) y, por otro lado, cinco réplicas de 7 muestras de ADN positivas para uno o varios patógenos.

El kit ha demostrado tener una muy buena precisión intraensayo, obteniéndose siempre el mismo genotipado en las muestras y una sensibilidad semejante.

PRECISIÓN INTERDÍA

Se ha estudiado la precisión interdía de STD Panel Strip mediante el análisis de una curva de sensibilidad (diluciones un ADN control compuesto por una mezcla de ADNs de todos los patógenos detectados con el kit) y 7 muestras reales. Cada análisis fue realizado por una misma persona, utilizando un mismo lote de producto y a lo largo de cinco días consecutivos.

El kit ha demostrado una buena reproducibilidad variando el día. Al igual que en la precisión intraensayo, todos los días se obtuvo un mismo serotipado en las muestras y una sensibilidad parecida.

PRECISIÓN INTERLABORATORIO

Se ha estudiado la precisión interlaboratorio mediante el análisis de 7 muestras reales, por duplicado. Cada análisis fue realizado por una persona diferente, en el mismo día y utilizando el mismo lote de producto. Para variar al máximo las condiciones de uso del kit, cada operador utilizó un termociclador y un termoagitador diferentes.

Al igual que en las pruebas anteriores, el kit mostró una buena reproducibilidad variando el operador y condiciones.

PRECISIÓN INTERLOTE

Se ha estudiado la precisión interlote del kit STD Panel Strip mediante el análisis con tres lotes diferentes del producto de, por un lado, diluciones seriadas de ADNs de cada uno de los patógenos y, por otro, 52 muestras de ADN reales.

El kit ha mostrado una buena precisión interlote. Los resultados obtenidos con las 52 muestras de ADN fueron idénticos en todos los casos y los resultados obtenidos en las curvas de sensibilidad semejantes.



STD Panel Strip

Test for the detection of 10 pathogens associated to sexually transmitted diseases

INTENDED USE

The STD Panel Strip test is a test based on the reverse blot technique that allows the qualitative detection of 10 pathogens associated to sexually transmitted diseases: *Chlamydia trachomatis* (discriminating variants L1, L2 and L3, that cause lymphogranuloma venereum), *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Herpes simplex 1*, *Herpes simplex 2*, and *Treponema pallidum*.

Through comparative analysis of described sequences using BLAST and BioEdit software the detection of all different serotypes/genetic sequences described for all the pathogens has been verified. So, all *Chlamydia trachomatis* serotypes (A, B, B_α, C, D, D_α, E, F, G, H, I, I_α, J, J_α, K, L₁, L₂ y L₃) and *Ureaplasma* spp serovars (1-14) are detected.

The product may be used for any indication that involves the identification of the previously mentioned pathogens: initial diagnosis, screening, monitoring.

Take also under consideration other parameters such as symptoms or clinical history when giving the final diagnosis.

PRINCIPLE

The STD Panel Strip kit is based on the principle of reverse hybridization, and allows the detection and identification of 10 pathogens associated to sexually transmitted diseases in DNA samples.

At present, sexually transmitted diseases (STDs) make up the most common group of infectious diseases that must be reported in the majority of the world's countries. Their incidence is elevated, and more than 20 pathogenic micro-organisms are known to be transmitted by sexual contact, with *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma* (*genitalium* and *hominis*) being the most common.

The majority of STDs have treatments and are curable. They affect both men and women, with 2/3 of cases in those under 25 years of age. They can occur without any symptoms appearing, especially in women, but the disease is not cured unless appropriate treatment is received. If untreated, they can cause serious health problems, such as infertility, blindness, mental disorders, physical birth defects, increased odds of developing cancer, heart disease, and even death. Depending on the disease, the infection can be transmitted through any type of activity involving the sexual organs; it can also be transmitted by contact with blood during sexual activity.

The current permanent trend of increasing sexually transmitted diseases, especially among young people under 25 years, makes their early and accurate diagnosis of great interest.

The procedure of kit STD Panel Strip consists in three steps: a) DNA extraction, b) amplification by PCR and c) hybridization/developing.

a) DNA extraction

Reagents not included in the kit.
See "SAMPLES" section.

b) PCR amplification

The STD Panel Strip includes the reagents needed to perform specific genetic sequence amplification of the pathogens detected with the kit. The genes used in each case are presented in the following table:

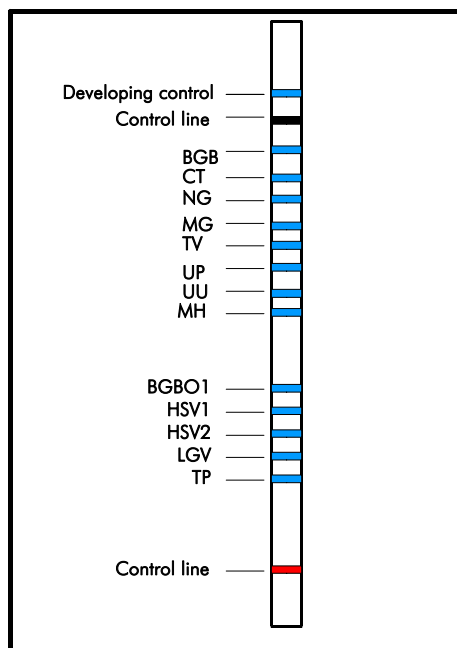
| Pathogen | Gen / Locus | Pathogen | Gen / Locus |
|-----------------------|-----------------|---------------------------------------|------------------|
| <i>C. trachomatis</i> | Omp | <i>Herpes virus</i> | DNA polimerase |
| | Cryptic plasmid | <i>C. trachomatis</i> (L1, L2, L3) | pmpH |
| <i>T. vaginalis</i> | TRIDNATARP | <i>T. pallidum</i> | DNA polimerase I |
| <i>M. genitalium</i> | MgPA 190 | Control gen B | β -globin |
| <i>Ureaplasmas</i> | Urease (Ure B) | | |
| <i>M. hominis</i> | gap | | |
| <i>N. gonorrhoeae</i> | Opa | | |
| | Por A | | |
| Control gen A | β -globin | | |

During PCR, two regions of the human control gene (β -globin) are also amplified.

c) Hybridization and development

Specific binding of PCR-amplified DNA fragments takes place during this step, using a series of probes that are covalently bound to a nylon membrane.

The membranes are covalently bound to probes specific to each one of the detected microorganisms, along with probes for the two regions of the control gene (BGB and BGBO1), a developing control line and two lines, one black and one red, for the control of the strip's position to aid in the interpretation of results (see attached drawing).



The detection of the fragments that hybridize to the different probes is carried out using a streptavidin-peroxidase conjugate that binds to a biotin marker added to the PCR-amplified DNA fragments. Following the addition of a peroxidase substrate (TMB), a blue precipitate appears in the locations where hybridization has taken place. The end result of the test is a pattern of bands that can be interpreted with the help of a control strip.

KIT CONTENTS

| STD Panel Strip | | | Kit 16 tests | Kit 48 tests |
|--------------------------|----------------------|--------------|------------------|------------------|
| | Membranes | STRIPS | 16 strips | 48 strips |
| | 8 channel tray | PL | 2 | -- |
| PCR reagents REAG PCR | PCR Mix | REAG PCR MIX | 2 x 0,80 ml | 3 x 1,40 ml |
| | Primers | REAG PRIMER | 0,110 + 0,110 ml | 0,275 + 0,275 ml |
| | Taq | REAG TAQ HS | 0,050 ml | 0,120 ml |
| | Denaturing | SOLN DN | 1 ml | 2 x 1 ml |
| | Hybridization buffer | BUF HYB | 60 ml | 125 ml |
| | Wash buffer 1 | BUF WASH 1 | 100 ml | 250 ml |
| | Conjugate | CONJ HRP | 60 ml | 125 ml |
| | Wash buffer 2 | BUF WASH 2 | 130 ml | 350 ml |
| | Substrate | SUBS TMB | 30 ml | 65 ml |
| | Instructions | | 1 | 1 |
| | Interpretation chart | | 1 | 1 |

MATERIALS NOT INCLUDED IN THE KIT

The following additional material is required when using the kit:

1. Microtubes for PCR
2. Micropipettes and micropipette tips (sterile or UV-irradiated and ideally with a filter)
3. Tweezers and a pencil (optional)
4. Chronometer
5. Thermometer

REQUIRED EQUIPMENTS FOR KIT DEVELOPMENT

1. Thermocycler
The following thermocyclers have been successfully used with the kit: 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems), MJ Mini Gradient Thermal Cycler (BioRad), Mastercycler Personal (Eppendorf), S1000 Thermal Cycler (BioRad).
2. Thermoshakers
The kit has been validated with the following thermoshakers: PST-60HL (Biosan S.L.), Profiblot T30 and T48 (Tecan), Autoblots 3000H (medTEC), TENDIGO (Fujirebio), Dynablot Heat (Dynex).
3. BLOTrix S1 or BLOTrix R2 scanner (BioSciTec, optional).

PRECAUTIONS

1. Only use the reagents *in vitro*.
2. Strictly follow the instructions provided. Modifying any of the prescribed **steps or temperatures** may severely affect the test results.

3. All the materials and reagents used must be free of DNAses. The use of filtered pipette tips is recommended for PCR preparation to prevent aerosol contamination. Ensure that all the usual precautions are taken in the preparation of the amplifications. Use autoclaved material for the hybridization/development process.
4. Store the kit components as indicated in the instructions.
5. Do not exchange components from kits with different lot numbers.
6. Do not use kit components after the expiration dates.
7. Strips are for single-use.
8. Supplied trays are for single-use.
9. Each channel of the supplied trays is for just one strip.
10. If the package is broken, the product can still be used providing none of the components have been damaged.
11. The used product should be discarded in compliance with current legislation.
12. Patient samples must always be treated as potentially infectious. Environmental and safety standards must be adhered to.
13. Once it is used, it is advisable to manipulate the strip taking into account the same considerations as for the sample. The strips have to be manipulated with the proper precautions and should be managed as biohazardous material.
14. The denaturation solution contains < 2% NaOH and is an irritant to both eyes and skin (H314 and P280, P305, P351, P338, P310).
15. Do not discard the external box of the kit until its content has been totally used. The external box contains essential information regarding the EC marking and component lots.

STORAGE

Store all reagents at 2-8 °C. Precipitates may appear in some solutions (hybridization buffer, wash buffers 1 and 2, conjugate) owing to storage at 2-8 °C. The precipitates are dissolved again when they are brought back to room temperature (conjugate) or heated to 42 °C (hybridization buffer and wash buffers 1 and 2).

The expiry date of all the reagents is printed on the label.

SAMPLES

The test has been designed and validated for use with DNA obtained from smears of various origins (urethral, endocervical, rectal, vaginal), and from urine.

For the smears, use sterile and dry cotton swabs or brushes to take the sample. Ensure enough sample is obtained, but without causing bleeding. Place the swab in a tube in an adequate transport medium (for example, Amies-Stuart medium or Cobas PCR Female Swab Sample Packet by Roche Molecular Systems).

For urine samples, you should ask the patient to collect the first 10-20 ml of urine in a sterile tube, having refrained from urinating for at least two hours before sampling.

The quality and concentration of the DNA extracted is of vital importance for the proper performance of the kit. The presence of inhibitors in the sample or low DNA concentration could reduce the sensitivity of the test.

Some of the DNA extraction procedures that have been evaluated with satisfactory results with STD Panel Strip are:

- a) Manual DNA extraction with silica resins: QIAamp DNA Mini Kit (it is recommended to follow the procedure described for viruses) or MinElute Virus Spin Kit (Qiagen).
In the case of dry swabs, resuspend its content with 200 – 1000 µl of phosphate buffer (PBS) and continue with the extraction.
With QIAamp DNA Mini Kit: we recommend the extraction of 200 µl of smear and elution with 100 µl of TE or elution buffer.

With MinElute Virus Spin Kit: we recommend the extraction of 200 μl of smear and elution with 20-50 μl of TE or elution buffer.

- b) DNA extraction with COBAS 4800 platform (Roche Diagnostics): follow the manufacturer's instructions.
- c) DNA extraction with QiaCube platform (Qiagen): follow the manufacturer's instructions.

Store the DNA samples at 2-8 °C if they are going to be used shortly after, or at -20 °C for longer periods of storage.

INTERFERING SUBSTANCES

Cervical specimens may contain interfering substances that are known to inhibit PCR reactions. These substances include, but are not limited to, the following: whole blood (human), leukocytes and contraceptive and feminine hygiene products, like contraceptive jellies, anti-fungal creams, spermicides, vaginal lubricants, etc).

Most of these interfering substances will be eliminated during DNA extraction. In case of a DNA sample with any inhibitor, it will be detected by the absence of amplification of control genes amplified during the PCR reaction.

STD PANEL STRIP PROCEDURE

1.- Polymerase chain reaction

PCR preparation

Important: before opening the vials with the PCR reagents centrifuge them briefly. This will ensure that all the contents will be at the bottom of the tube.

For each sample two amplification reactions will be run: one of them with primers A (vial with blue cap) and another one with primers B (vial with white cap). PCR Premix and Taq reagents are common to both reactions.

- Prepare the required PCR tubes based on the number of DNAs to be amplified (two per sample).
- Add to each PCR tube: 39 μl of PCR premix + 5 μl of primers (A or B) + 1 μl of Taq + 5 μl of DNA. Mix well. If possible, keep the reagents and the mixtures at 2-8 °C during the preparation. If various DNA samples are to be amplified, preparing a common mixture with all the reagents is recommended to finally add 45 μl of mixture + 5 μl of DNA. For example:

| N° of PCRs | PCR premix | Primers (A or B) | Taq |
|------------|---------------------|--------------------|-------------------|
| 1 | 39 μl | 5 μl | 1 μl |
| 3 | 136,5 μl | 17,5 μl | 3,5 μl |
| 5 | 214,5 μl | 27,5 μl | 5,5 μl |
| 8 | 351 μl | 45 μl | 9 μl |

- *The mixtures containing all PCR reagents should always be prepared in excess to compensate for the loss of volume that takes place during the pipetting process.*

Due to requirements of "good laboratory practice", the user should also include a negative control (e.g. water or TE buffer) to exclude contamination and, if required, a positive control (not included in the kit).

Amplification

Regard the importance of getting a suitable concentration of the DNA to get a proper result.

Place the tubes into the cycler device (if required, add 1 drop of Nujol oil on top of every PCR reaction) and amplify DNA by the following program:

94 °C, 5 min
40 cycles of: 94 °C, 15 sec
57 °C, 1 min 30 sec
72 °C, 45 sec
72 °C, 5 min
4 °C

→ See the PCR preparation diagram in the Annex of the document.

Once the PCR is finished, continue with the developing of the strip. If the samples are not to be tested immediately, they must be stored at 2-8 °C for no more than 24 hrs. For longer storage, freeze at -20 °C.

2.- Strip developing

On request, Operon will provide the user with the working procedure for the specific instrument to be used for processing the strips (PST-60HL, Profiblot, Autoblots 3000H, TENDIGO or Dynablot Heat). Alternatively, please refer to the following web address:

<https://operon.es/products-protocols/>

For each sample, mix the same volume of PCR A and PCR B (for example, 15 µl + 15 µl) and continue with working procedure for the specific instrument to be used. In the denaturing step, **25 µl of denaturation buffer + 25 µl of the mixture of PCRs** will be dispensed in the tray.

The product has been tested using different work platforms. For your information, the commercial names of the work platforms used are specified, which does not imply an exclusive use of such trademarks but the work protocol. The product works correctly as long as the platform used ensures the temperature program raised for the product.

3.- Strip interpretation

Strip interpretation can be done visually, using the evaluation chart included in the kit (see working procedures for each instrument) or automatically, with BLOTRix R2 or BLOTRix S1 scanners (BioSciTec).

On request, OPERON, S.A. will provide the user with the instructions for the automatic strip interpretation with the scanners (DO-09053004 "Instructions of use BLOTRix R2_S1"). Alternatively, please refer to the following web address:

<https://operon.es/products-protocols/>

Important: results of strips interpretation with the scanners must always be visually verified; very faint bands could be not detected by the instruments.

RESULTS

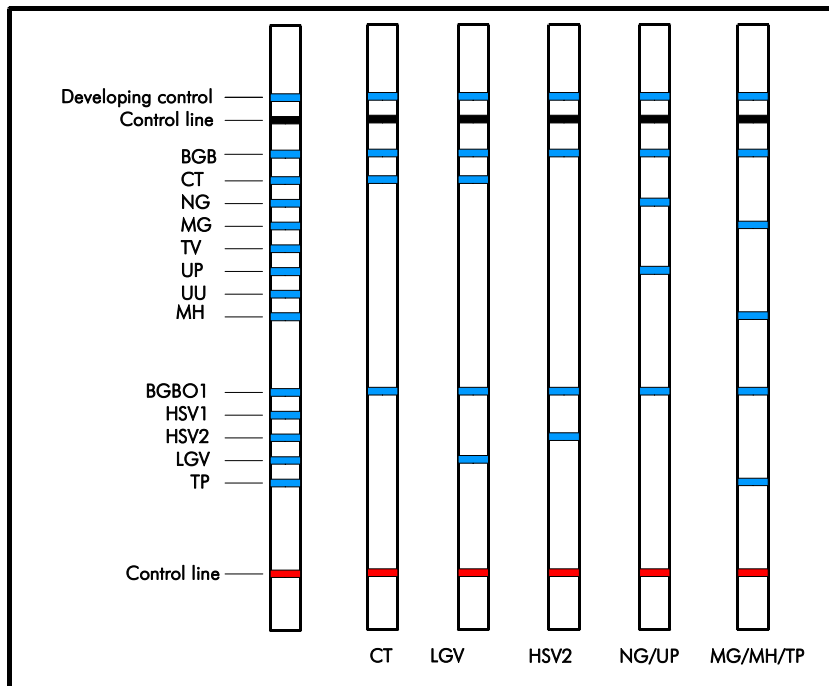
The STD Panel Strip kit allows the detection and identification of 10 pathogens associated to sexually transmitted diseases: *Chlamydia trachomatis* (CT) and its variants L1, L2 and L3 that cause lymphogranuloma venereum (LGV), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Mycoplasma genitalium* (MG), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Ureaplasma parvum* (UP), *Ureaplasma urealyticum* (UU), *Mycoplasma hominis* (MH), *Herpes simplex 1* (HSV1), *Herpes simplex 2* (HSV2), and *Treponema pallidum* (TP).

A DNA sample may render the following results:

- Only the control bands (BGB and BGBO1): none of the pathogens detected by this kit is present or could be amplified.
- The control bands and one band associated to a certain pathogen: sample positive for that particular pathogen.
- The control bands and several bands associated to different pathogens: positive sample with multiple infection.
- One or several bands associated to different pathogens: positive sample for those pathogens in which the control genes do not amplify. This may happen, for example, when the sample has a high

number of copies of one or more pathogens, as the PCR conditions have been designed to favour the amplification of pathogen DNA versus that of the internal controls. The presence of the control bands is compulsory for a negative sample but optional for a positive sample.

Examples of genotyping STD Panel Strip



Attention: in the case of *Lymphogranuloma venereum* (LGV), as it is a variant of *Chlamydia trachomatis*, the bands associated with *C. Trachomatis* will appear along with those for LGV.

QUALITY CONTROL

The development control line should always appear above the upper black line. Its absence will be indicative of issues encountered during the product hybridization/development stage.

The strip corresponding to the amplification of the negative control will show only the developing control band.

For negative samples, the presence of the band associated to the internal controls (BGB and BGBO1) is required to confirm that it is a true negative. The absence of this band in a negative sample is indicative of the absence of amplification during the PCR, which can be caused by lack of DNA (measure concentration), by degradation or by the presence of PCR inhibitors in the sample (hemoglobin, traces of salts, etc.).

FEATURES / EXTERNAL AND INTERNAL EVALUATIONS

The use of this test is restricted to professional users that are familiar with the methods used in Molecular Biology.

The test has been evaluated with several DNA samples from different origin in several evaluations that are shown below. The first 10 evaluations were performed in the facilities of OPERON, S.A., while the evaluation n° 11 was performed in the premises of the Centro de Análisis Genéticos (CITOGEN, Zaragoza, España). All comercial kits used were CE marked.

Evaluation n° 1

The sensitivity and specificity of detection of *Trichomonas vaginalis* was analysed using 77 DNA samples extracted from fresh cervico-vaginal smears previously evaluated by analysis with light microscopy and confirmation with specific culture medium (Dept. Microbiology, University Hospital of Zaragoza). The extraction of DNA samples was carried out with the DNA Mini Kit (Qiagen).

The concordance of sensitivity and specificity between methods was 100% and 94.4%, respectively. Of the 18 negative samples by microscopy/culture, one gave a positive result with the STD Panel Strip kit. This positive was confirmed by PCR analysis of two alternative genetic regions of the protozoan.

Evaluation n° 2

The sensitivity and specificity of detection of *Chlamydia trachomatis*, serotypes L1, L2 and L3, which cause *Lymphogranuloma venereum*, were analysed. For sensitivity, 10 DNA samples previously evaluated by Real Time PCR (routine procedures at Miguel Servet Hospital in Zaragoza, University Hospital of Donostia in San Sebastián and Valme Hospital in Seville) were used. For specificity, 13 DNA samples extracted with Qiagen's Qiacube system were used and evaluated with the RealCycler THLV kit (Progenie).

The concordance of sensitivity and specificity obtained between methods was 100%.

Evaluation n° 3

The sensitivity and specificity of detection of *Treponema pallidum* were analysed using 13 DNA samples (2 positive and 11 negative) extracted with Qiagen's Qiacube system and evaluated with the RealCycler THLV kit (Progenie).

The concordance of sensitivity and specificity obtained between methods was 100%.

Evaluation n° 4

The sensitivity and specificity of detection of HSV1 were analysed using 24 DNA samples (15 positive and 9 negative) extracted with Qiagen's Qiacube system and analysed with the Fluorotype HSV kit (Hain).

The concordance of sensitivity and specificity obtained between methods was 100%.

Furthermore, the sensitivity and specificity of detection of HSV1 were analysed with 68 samples (28 positive and 40 negative) extracted with the COBAS 4800 platform and analysed with the LightCycler HSV1/2 Qual kit (Roche).

The concordance of sensitivity and specificity obtained between methods was 96.4 and 100%, respectively. A single false negative was found with the STD Panel Strip kit, which corresponded to a sample with a Ct of 40 with the LightCycler HSV1/2 kit (Roche).

Evaluation n° 5

The sensitivity and specificity of detection of HSV2 were analysed using 24 DNA samples (9 positive and 15 negative) extracted with Qiagen's Qiacube system and analysed with the Fluorotype HSV kit (Hain).

The concordance of sensitivity and specificity obtained between methods was 88.9 and 100%, respectively. A positive sample was negative for HSV2 with the STD Panel Strip kit, but positive for *Treponema pallidum* (confirmed with the RealCycler THLV kit by Progenie).

Furthermore, the sensitivity and specificity of detection of HSV1 were analysed with 68 samples (40 positive and 28 negative) extracted with the COBAS 4800 platform and analysed with the LightCycler HSV1/2 Qual kit (Roche).

The concordance of sensitivity and specificity obtained between methods was 97.5 and 100%, respectively. A single false negative was found with the STD Panel Strip kit, which corresponded to a sample with a Ct of 42.5 with the LightCycler HSV1/2 kit (Roche).

Evaluation n° 6

The sensitivity and specificity of detection of *Chlamydia trachomatis* were analysed using 197 DNA samples (55 positive and 142 negative) extracted with Qiagen's Qiacube system and analysed with the Dx CT/NG/MG Assay kit (BioRad).

The concordance of sensitivity and specificity obtained between methods was 100 and 99.3%, respectively. A negative sample tested positive for CT with the STD Panel Strip kit.

Furthermore, the sensitivity of detection of *Chlamydia trachomatis* was analysed with 50 positive samples extracted with the COBAS 4800 platform and analysed with the CT/NG Cobas 4800 kit (Roche).

The concordance of sensitivity obtained between methods was 100%.

Evaluation n° 7

The sensitivity and specificity of detection of *Neisseria gonorrhoeae* were analysed using 193 DNA samples (76 positive and 117 negative) extracted with Qiagen's Qiacube system and analysed with the Dx CT/NG/MG Assay kit (BioRad).

The concordance of sensitivity and specificity obtained between methods was 98.7 and 100%, respectively. One positive sample gave a negative result for NG with the STD Panel Strip kit. The sample also resulted negative with the NG OligoGen kit (Operon).

Furthermore, the sensitivity of detection of *Chlamydia trachomatis* was analysed with 50 positive samples extracted with the COBAS 4800 platform and analysed with the CT/NG Cobas 4800 kit (Roche).

The concordance of sensitivity obtained between methods was 100%.

Evaluation n° 8

The sensitivity and specificity of detection of *Mycoplasma genitalium* were analysed using 193 DNA samples (86 positive and 107 negative) extracted with Qiagen's Qiacube system and analysed with the Dx CT/NG/MG Assay kit (BioRad).

The concordance of sensitivity and specificity obtained between methods was 94.2 and 100%, respectively.

Evaluation n° 9

The sensitivity of detection of *Ureaplasma spp.* (*Ureaplasma parvum* + *Ureaplasma urealyticum*) was analysed using 31 samples of cervico-vaginal smears preserved in Amies-Stuart medium. These samples had been previously analysed with the Mycoplasma IST 2 kit (BioMerieux), resulting in 30 positives and 1 negative. DNA extraction from the smears was carried out with the DNA Mini Kit (Qiagen).

The concordance of sensitivity obtained between methods was 96.7%. One of the positive samples with the Mycoplasma IST 2 kit proved negative for *Ureaplasma* with the STD Panel Strip kit, but positive for *Mycoplasma hominis*. The analysis of the sample with three individual PCRs with different target regions of the urease gene also gave a negative result for *Ureaplasma*.

The only negative sample from the study resulted positive with the STD Panel Strip kit. It does not apply to assess the concordance of specificity, having studied only one negative sample, but it is important to point out that the Mycoplasma IST 2 kit only gives a positive signal for counts greater than 1,000 CCU/ml, while the STD Panel Strip does not have that limitation. The positive sample was confirmed with individual PCRs of three different regions of the urease gene of *Ureaplasma*.

Furthermore, the sensitivity and specificity of detection of *Ureaplasma spp.* (*Ureaplasma parvum* + *Ureaplasma urealyticum*) were analysed using 64 samples of cervico-vaginal smears preserved in Amies-Stuart medium. These samples had previously been analysed with the Mycoview kit (Zeacon Diagnostics), resulting in 49 positives and 15 negatives. DNA extraction from the smears was carried out with the DNA Mini Kit (Qiagen).

The concordance of sensitivity and specificity obtained between methods was 92 and 73.3%, respectively. Three of the positive samples using the Mycoview kit proved negative for *Ureaplasma* with the STD Panel Strip kit. The analysis of these samples with three individual PCRs with different target regions of the urease gene also gave a negative result for *Ureaplasma* in all cases.

Of the 15 negative samples from the study, four resulted positive with the STD Panel Strip kit. The four positive samples were confirmed with individual PCRs of three different regions of the urease gene of *Ureaplasma*. It should be noted that the Mycoview kit, as with the Mycoplasma IST 2 kit, only gives a positive signal for counts greater than 1,000 CCU/ml, while the STD Panel Strip does not have that limitation.

Evaluation n° 10

The sensitivity and specificity of detection of *Mycoplasma hominis* were analysed using 32 samples of cervico-vaginal smears preserved in Amies-Stuart medium. These samples had been previously analysed with the Mycoplasma IST 2 kit (BioMerieux), resulting in 2 positives and 30 negatives. DNA extraction from the smears was carried out with the DNA Mini Kit (Qiagen).

The concordance of sensitivity and specificity obtained between methods was 50 and 70%, respectively. Of the two positive samples with the Mycoplasma IST 2 kit, one proved negative with the STD Panel Strip, but positive for *Ureaplasma parvum*. This positive was confirmed with individual PCRs of three different regions of the urease gene of *Ureaplasma*. Of the 30 negative samples, 9 resulted positive for *Mycoplasma hominis* with the STD Panel Strip kit. The 9 samples were confirmed as positive with an alternative individual PCR for *Mycoplasma hominis* and hybridisation to a specific probe. As is the case with *Ureaplasma* spp., the Mycoplasma IST 2 kit only gives a positive signal for *Mycoplasma hominis* for counts greater than 1,000 CCU/mL.

Furthermore, the sensitivity and specificity of detection of *Mycoplasma hominis* were analysed using 64 samples of cervico-vaginal smears preserved in Amies-Stuart medium. These samples had previously been analysed with the Mycoview kit (Zeacon Diagnostics), resulting in 19 positives and 45 negatives. DNA extraction from the smears was carried out with the DNA Mini Kit (Qiagen).

The concordance of sensitivity and specificity obtained between methods was 57.9 and 97.8%, respectively. Of the 19 positive samples with the Mycoview kit, 8 proved negative with the STD Panel Strip; all of them were positive for *Ureaplasma*. These negatives were confirmed using an alternative PCR for *M. hominis*; at the same time, the positivity for *Ureaplasma* was confirmed using individual PCRs for three different regions of the urease gene for *Ureaplasma* spp. Of the 45 negative samples, one resulted positive for *Mycoplasma hominis* with STD Panel Strip; that sample was confirmed with an individual alternative PCR for *Mycoplasma hominis* and hybridisation to specific probes. As is the case with the Mycoplasma IST 2 kit, Mycoview only gives a positive result for *M. hominis* for counts greater than 1,000 CCU/ml.

The concordance of sensitivity for *M. hominis* between Mycoplasma IST2 (50%) or Mycoview (57.9%) is very low. These kits take advantage of the biochemical properties of *Ureaplasmas* and *Mycoplasmas* and are based on the observation of a colour change from yellow to purple when urea (*Ureaplasma* spp.) or arginine (*Mycoplasma hominis*) metabolism occurs.

There are publications that indicate that these tests have problems with false positives, particularly for *M. hominis*. In one of these (Biernat-Sudolska M.), an analysis of a total of 5,715 samples is conducted, of which 240 give a positive result for *M. hominis*, while a total of 176 were confirmed as false positives. In all cases, the presence of *Ureaplasmas* with a titre > 10,000 CFU/ml was demonstrated (as occurs in our study).

Evaluation n° 11

The diagnostic sensibility and specificity for the different microorganisms detected with TD Panel Strip was compared with the kits CLART Panel STIsA/STIsB (Genomica). Both kits were used to evaluate 81 DNA samples isolated from smears of different origin (endocervical, vaginal, urethral, pharyngeal, rectal) using the DNA Mini Kit (Qiagen). The obtained results are shown in the following table:

| Final concordance by microorganism between methods | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------------------------|------|------|-----|-----|------|------|------|------|------|------|-----|
| | CT | NG | MG | TV | UP | UU | MH | HSV1 | HSV2 | LGV | TP |
| Sensibility | 100 | 94,1 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | NA | 100 |
| Specificity | 96,8 | 100 | 100 | 100 | 89,6 | 88,6 | 95,9 | 100 | 98,5 | 98,8 | 100 |

All the discordant samples were confirmed in favour of STD Panel Strip kit.

POTENTIAL ISSUES

1. No bands appear on the strip, including the control band.

- The conjugate and/or developer were not balanced at room temperature.
- The conjugate and/or developer were not added, or were added in too small quantity.

2. Only the control band appears

- PCR amplification has failed (check with an agarose gel).
- The PCR was not added, or was added in too small quantity in the hybridization step.
- Incorrect hybridization or wash 1 buffers temperature (higher than instructed).
- Incorrect incubator temperature (higher than instructed).

3. The strip has a strong background colour following development

- The washing steps were not performed effectively (wrong timing, buffer quantity too small, cold buffers).

4. Non-homogenous strip staining

- Inadequate shaking (please review the plate thermo-shaker programme).
- The strips were not entirely submerged during the incubations.

5. Unexpected results

- Inadequate incubation and/or buffer/reagent temperatures.
- PCR contamination (verify using a negative control).
- Contamination of adjacent channels owing to the transfer of liquid from one channel to another when adding the hybridization buffer.

The ideal temperature for carrying out the hybridisation process is 42 °C. Between 39 and 42 °C, the test has shown similar performance, without the appearance of non-specific reactions; temperature above 43 °C may cause a slight reduction in band intensity and kit sensitivity.

SENSITIVITY

We define **the limit of detection** of the kit as the minimum amount of DNA/RNA that can be detected with the test.

We define **the test limit** as the minimum amount of DNA/RNA that we can always genotype or always detect with the test.

Both limits have been determined for each one of the pathogens detected with the STD Panel kit. For this, 1/10 serial dilutions of DNA were analysed from each one of them, with three different product batches.

The sensitivity results obtained are shown in the following table:

| | Limit of detection | Limit of the test |
|-----------|--------------------|-------------------|
| CT | 1 copy | 3 copies |
| NG | 2 copies | 6 copies |
| MG | 0,00000128 ng | 0,000032 ng |

| | Limit of detection | Limit of the test |
|------|--------------------|-------------------|
| TV | 1 copy | 3 copies |
| UU | 0,000032 ng | 0,00016 ng |
| MH | 0,000032 ng | 0,00016 ng |
| HSV1 | 6 copies | 12 copies |
| HSV2 | 2 copies | 6 copies |
| LGV | 12 copies | 12 copies |
| TP | 3 copies | 6 copies |

SPECIFICITY

Through the analysis of a large number of negative samples we can exclude the presence of cross reactions with the typical microbiota of the urogenital tract. In this group of microorganisms are included: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Mycoplasma*, *Atopobium*, *Peptococcus*, *Petostreptococcus*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella*.

On the other hand, the specificity of the kit has been evaluated by analysing the DNAs of microorganisms that have been more frequently associated with diseases of the urogenital tract. In addition, we have included in the study the bacteria *C. psittaci*, due to its genetic homology in *Omp* gene with the one of *C. trachomatis*.

The absence of cross-reaction has been checked for the following pathogens:

| Microorganism | Type | Quantity in PCR | Result |
|---------------------------------------|----------------------------------------|-----------------|-------------------------------|
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | 434 Strain, ATCC, LGVII | 66500 copies | <i>C. trachomatis</i> |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | Clinical isolate | 72500 copies | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> |
| <i>Mycoplasma genitalium</i> | NCTC10195 | 0,5 ng | <i>Mycoplasma genitalium</i> |
| <i>Trichomonas vaginalis</i> | Clinical isolate | 74000 copies | <i>Trichomonas vaginalis</i> |
| <i>Ureaplasma urealyticum</i> | NCTC 010112 | 0,5 ng | <i>Ureaplasma urealyticum</i> |
| <i>Mycoplasma hominis</i> | NCTC 10111 | 0,5 ng | <i>Mycoplasma hominis</i> |
| <i>Herpes simplex 1</i> | MacIntyre Strain (ATCC VR-539) | 90000 copies | <i>Herpes simplex 1</i> |
| <i>Herpes simplex 2</i> | MS Strain (ATCC VR-540) | 80000 copies | <i>Herpes simplex 2</i> |
| <i>Treponema pallidum</i> | Nichols strain | 3500 copies | <i>Treponema pallidum</i> |
| <i>E.coli</i> | JM109Strain | 88 ng | Negativo |
| <i>Haemophilus ducreyi</i> | NC10945 | 90 ng | Negativo |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | Stableforth G19 Strain (CECT 183) | 27400 copies | Negativo |
| <i>Staphylococcus Aureus mecA (-)</i> | Subspecies Aureus (CECT 239) | 15 ng | Negative |
| <i>Candida albicans</i> | NCPI 3152 Strain(UKNCC) | 100 ng | Negative |
| <i>Staphylococcus Aureus mecA (+)</i> | Subspecies Aureus (N° 13661) | 95,6 ng | Negative |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | Serotype B. NCTC 1026. | 37200 copies | Negative |
| <i>Gardnerella vaginalis</i> | ATCC 14018 | 32400 copies | Negative |
| <i>Chlamydophila psittaci</i> | Cepa 6 BC | 30000 copias | Negative |
| HPV | 6, 11 | 5 ng | Negative |
| HPV | 16, 18, 31, 39, 51, 53, 56, 58, 59, 82 | Real sample | No cross-reaction |

In the case of *T. pallidum*, the kit doesn't distinguish *T. pallidum pallidum* (causing syphilis) from *T. pallidum pertenuis* and *T. paraluisancuniculi*.

T. paraluisancuniculi is a bacterium that infects rabbits and there are no described zoonoses.

T. pallidum pertenuis does infect humans, primarily those under age 15. It causes a tropical disease called pian, which affects the skin, bones, and cartilage. It is not a sexually transmitted disease. It is transmitted by direct (person-to-person), non-sexual contact with the exudate of the lesions of an infected person.

HOOK EFFECT

Increasing DNA quantities of each of the pathogens detected with the kit have been analysed, without observing inhibition of the signal or the appearance of cross-reactions that may be associated with the Hook Effect.

There is therefore no Hook Effect.

INTRA-ASSAY PRECISION

The intra-assay precision of STD Panel has been studied examining, first, 5 sensitivity curves (dilutions of a control DNA consisting of a mixture of DNA from all the pathogens detected by the kit) and on the other side, five replicates of 7 DNA samples positive for one or several pathogens.

Overall, the kit has shown a good intra-assay precision, obtaining the same genotyping for the samples and a similar sensitivity.

INTER-DAY PRECISION

The inter-day precision of STD Panel Strip has been studied examining, first, a sensitivity curve (dilutions of a control DNA consisting of a mixture of DNA from all the pathogens detected by the kit) and on the other side, 7 real DNA samples. Each sensitivity curve was constructed by the same operator, using the same product lot and over five consecutive days.

Overall, the kit has shown a good inter-day precision, obtaining the same genotyping for the samples and a similar sensitivity.

INTER-LAB PRECISION

The inter-lab precision has been studied examining 7 real DNA samples, by duplicate. Each analysis was performed by a different operator, on the same day and using the same product lot. To vary the most of the conditions of use of the kit, each operator used a thermal cycler and different thermoshaker.

Overall, the kit has shown a good inter-lab precision, obtaining the same genotyping for the samples and a similar sensitivity.

INTER-LOT PRECISION

The inter-lot precision of STD Panel Strip kit has been studied by the analysis using three different product lots of a sensitivity curve (dilutions of a control DNA consisting of a mixture of DNA from all the pathogens detected by the kit) and 52 real DNA samples.

The kit has shown a good inter-lab precision. The results obtained for the 52 DNA samples were identical in all cases, and a similar sensitivity.

IT

STD Panel Strip

Test per il rilevamento di 10 patogeni associati con malattie sessualmente trasmissibili

USO PREVISTO

Il test STD Panel Strip è un test basato sulla tecnica del blot inverso che permette il rilevamento qualitativo in base alla sequenza genetica, di 10 patogeni associati con malattie sessualmente trasmissibili: *Chlamydia trachomatis* (permette distinzione di varianti L1, L2 e L3 qui causa linfogranuloma venereo), *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Herpes simplex 1*, *Herpes simplex 2*, e *Treponema pallidum*.

Attraverso l'analisi comparativa delle sequenze descritte, utilizzando BLAST e BioEdit software, è stato verificato il corretto allineamento delle sequenze e la corretta identificazione dei sierotipi per tutti i patogeni. Cosicché sono stati identificati tutti i sierotipi di *Chlamydia trachomatis* (sierotipi A, B, Ba, C, D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, Ja, K, L1, L2 y L3) e di *Ureaplasma spp.*, (serovars 1-14).

Il prodotto può essere utilizzato per qualsiasi indicazione che comporta l'identificazione di patogeni citati: diagnosi iniziale, lo screening, monitoraggio.

Per la diagnosi finale occorre considerare anche altri parametri, come i sintomi presentati dal paziente e la sua storia clinica.

FONDAMENTO

Il kit STD Panel Strip è basato sul principio dell'ibridazione inversa e permette il rilevamento e l'identificazione di 10 patogeni associati con malattie sessualmente trasmissibili in campioni di DNA.

Attualmente, le malattie a trasmissione sessuale (MTS o STD) rappresentano il gruppo più diffuso di malattie infettive soggette a dichiarazione obbligatoria nella maggior parte dei paesi del mondo. Queste malattie presentano un'incidenza elevata e sono noti oltre 20 microrganismi patogeni che si trasmettono per contatto sessuale, i più frequenti dei quali sono *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* e *Mycoplasma (genitalium e hominis)*.

La maggior parte delle MTS possono essere trattate e sono curabili. Queste malattie colpiscono sia uomini che donne, che nei 2/3 dei casi hanno meno di 25 anni. È possibile essere affetti da queste malattie senza presentare alcun tipo di sintomo, soprattutto nel caso delle donne, ma la malattia non può essere curata senza ricevere il trattamento adeguato. Se non vengono trattate, possono causare gravi problemi di salute, come sterilità, cecità, disturbi mentali, difetti congeniti, aumento della probabilità di sviluppare un cancro, malattia cardiache e anche il decesso del paziente. A seconda della malattia, l'infezione può trasmettersi attraverso qualsiasi tipo di attività che coinvolga gli organi sessuali; inoltre, può essere trasmessa mediante il contatto col sangue durante l'attività sessuale.

L'attuale tendenza all'aumento permanente delle malattie a trasmissione sessuale, soprattutto tra i giovani di età inferiore a 25 anni, rende una diagnosi precoce e affidabile di grande interesse.

La procedura del kit STD Panel Strip kit prevede tre fasi: a) estrazione del DNA b) amplificazione tramite PCR e c) ibridazione/rivelazione.

a) Estrazione del DNA

Reagenti non inclusi nel kit.

Vedere il punto "CAMPIONI".

b) Amplificazione tramite PCR

Nel kit STD PanelStrip sono inclusi i reagenti necessari per eseguire l'amplificazione di sequenze genetiche specifiche dei sierotipi rilevabili con il kit. I geni utilizzati in ciascun caso sono mostrati nella tabella qui di seguito:

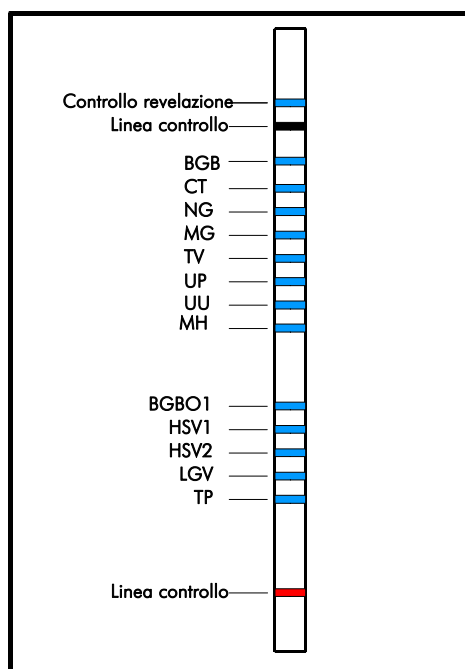
| Patogeni | Gene / Locus | Pathogen | Gene / Locus |
|-----------------------|-------------------|---------------------------------------|------------------|
| <i>C. trachomatis</i> | Omp | <i>Herpes virus</i> | DNA polimerasi |
| | Plasmide criptico | <i>C. trachomatis</i> (L1, L2, L3) | pmpH |
| <i>T. vaginalis</i> | TRIDNATARP | <i>T. pallidum</i> | DNA polimerasi I |
| <i>M. genitalium</i> | MgPA 190 | Control gen B | β -globina |
| <i>Ureaplasmas</i> | Ureasi (Ure B) | | |
| <i>M. hominis</i> | gap | | |
| <i>N. gonorrhoeae</i> | Opa | | |
| | Por A | | |
| Control gen A | β -globin | | |

Durante la PCR sono amplificati due regioni del gene controllo umano (β -globina).

c) Ibridazione e rivelazione

In questa fase ha luogo il legame specifico tra i frammenti di DNA amplificati durante la PCR e una serie di sonde depositate su membrane di nylon.

Sulle membrane sono legate con legame covalente sonde specifiche per ciascun microrganismo rilevato, oltre a sonde per i geni di controllo (BGB and BGBO1), una sonda di controllo della rivelazione e due linee, una nera e una rossa, per il controllo del posizionamento della striscia e come ausilio per l'interpretazione dei risultati (vedere la figura qui di seguito).



Il rilevamento dei frammenti ibridati con le diverse sonde si esegue utilizzando un coniugato (streptavidina-perossidasi) che si lega a una marcatura di biotina incorporata durante la PCR nei

frammenti di DNA amplificato. Dopo l'aggiunta di un substrato della perossidasi (TMB), si genera un precipitato di colore blu nei siti in cui è avvenuta l'ibridazione. Come risultato finale del test si ottiene un pattern di bande da interpretare con l'aiusilio della striscia di controllo.

MATERIALI INCLUSI NEL KIT

| STD Panel Strip | | | Kit 16 tests | Kit 48 tests |
|------------------------------|------------------------------|--------------|------------------|------------------|
| | Membrane | STRIPS | 16 strips | 48 strips |
| | Vaschetta 8 canali | PL | 2 | -- |
| Reagenti per PCR REAG PCR | PCR Mix | REAG PCR MIX | 2 x 0,80 ml | 3 x 1,40 ml |
| | Primers | REAG PRIMER | 0,110 + 0,110 ml | 0,275 + 0,275 ml |
| | Taq | REAG TAQ HS | 0,050 ml | 0,120 ml |
| | Denaturante | SOLN DN | 1 ml | 2 x 1 ml |
| | Tampone di ibridazione | BUF HYB | 60 ml | 125 ml |
| | Tampone di lavaggio 1 | BUF WASH 1 | 100 ml | 250 ml |
| | Coniugato | CONJ HRP | 60 ml | 125 ml |
| | Tampone di lavaggio 2 | BUF WASH 2 | 130 ml | 350 ml |
| | Substrato | SUBS TMB | 30 ml | 65 ml |
| | Istruzioni d'uso | | 1 | 1 |
| | Schema per l'interpretazione | | 1 | 1 |

MATERIALI NON INCLUSI NEL KIT

Per l'uso del kit sono necessari, inoltre, i seguenti materiali:

1. Microprovette per PCR.
2. Micropipette e punte per micropipette (sterili o irradiate con UV e, preferibilmente, con filtro).
3. Pinzette e matita (opzionale).
4. Cronometro.
5. Termometro.

APPARECCHI NECESSARI PER LO SVILUPPO DEL KIT

1. Termociclatore
Sono stati testati con successo i termociclatori qui di seguito: 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems), MJ Mini Gradient Thermal Cycler (BioRad), Mastercycler Personal (Eppendorf), S1000 Thermal Cycler (BioRad).
2. Termomixer
Il kit è stato validato con i termoagitatori: PST-60HL (Biosan S.L.), Profiblot T30 y T48 (Tecan), Autoblots 3000H (medTEC), TENDIGO (Fujirebio), Dynablot Heat (Dynex).
3. BLOTrix S1 or BLOTrix R2 scanner (BioSciTec, opzionale).

PRECAUZIONI

1. Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso *in vitro*.
2. Seguire rigorosamente le istruzioni fornite. La modifica di qualsiasi **punto della procedura o temperatura** può compromettere i risultati del test.
3. È essenziale che tutti i materiali utilizzati siano liberi di DNase. Si consiglia di utilizzare puntali di pipette con filtro nella preparazione di PCR, per evitare problemi di contaminazione per

formazione di aerosol. Seguire tutte le normali precauzioni necessarie per l'amplificazione del DNA. Utilizzare materiali autoclavato per il processo di ibridazione / rilevazione.

4. Conservare i componenti del kit nelle condizioni indicate.
5. Non scambiare componenti di kit con diverso numero di lotto.
6. Non utilizzare i componenti del kit dopo la data di scadenza.
7. Le strisce reattive sono monouso.
8. La vaschetta in dotazione sono monouso.
9. Ogni canale dei vassoi in dotazione è per una sola striscia.
10. In caso di rottura della confezione, è possibile utilizzare il prodotto sempreché nessuno dei componenti risulti danneggiato.
11. Il prodotto usato deve essere smaltito in conformità con la legislazione vigente.
12. I campioni dei pazienti devono sempre essere considerati come potenzialmente infettivi. Osservare tutte le norme ambientali e di sicurezza.
13. È opportuno che la striscia viene manipolato volta aver utilizzato le stesse considerazioni con il campione. Si raccomanda di gestirlo come materiale potenzialmente pericolosa.
14. La soluzione di denaturazione contiene < 2% di NaOH ed è irritante per gli occhi e per la pelle (H314 e P280, P305, P351, P338, P310).
15. Non gettare il box esterno del kit fino a quando il suo contenuto è stato completamente utilizzato. Il box esterno contiene le informazioni essenziali per la marcatura CE e per le lotti di componenti.

CONSERVAZIONE

Conservare tutti i reagenti a 2-8 °C. A causa della conservazione a 2-8 °C, in alcune delle soluzioni (tampone di ibridazione, tamponi di lavaggio 1 e 2, coniugati) potrebbero formarsi dei precipitati. Tali precipitati si ridisciolgono durante il riscaldamento a temperatura ambiente (coniugato) o a 42 °C (tampone di ibridazione e tamponi di lavaggio 1 e 2).

La data di scadenza di tutti i reagenti è indicata sull'etichetta.

CAMPIONI

Il test è stato progettato e validato per l'uso con DNA ottenuto da tamponi di diversa origine (uretrale, endocervicale, rettale, vaginale) e da urina.

Per la raccolta del campione, in caso di tampone utilizzare bastoncini ovattati o spazzolini asciutti e sterili. Assicurarsi di prelevare una quantità sufficiente di campione, ma senza provocare sanguinamento. Conservare il tampone in un tubo con terreno di trasporto adeguato (ad esempio, terreno di Amies-Stuart o il sistema Cobas PCR Female Swab Sample Packet di Roche Molecular Systems).

In caso di campioni di urina, occorre indicare al paziente di raccogliere i primi 10-20 ml di urina in un contenitore sterile, dopo essersi astenuto dall'urinare per almeno due ore prima della raccolta del campione.

La qualità e la concentrazione del DNA estratto sono di vitale importanza per il corretto funzionamento del kit. La presenza di inibitori nel campione o una bassa concentrazione di DNA potrebbe ridurre la sensibilità del test.

Di seguito sono indicate alcune delle procedure di estrazione del DNA testate con risultati soddisfacenti con il kit STD Panel Strip are:

- a) Estrazione del DNA con resine di silice: QIAamp DNA Mini Kit (Si raccomanda di seguire la procedura indicata per virus) o MinElute Virus Spin Kit (Qiagen).
In caso di tamponi a secco, risospingere il contenuto con 200 - 1000 μ l di tampone fosfato (PBS) e proseguire con l'estrazione.
In caso di utilizzo del kit QIAamp DNA Mini Kit: si raccomanda l'estrazione a partire da 200 μ l di campione ed eluire con 100 μ l di TE o tampone di eluizione

In caso di utilizzo del kit MinElute Virus Spin Kit: si raccomanda l'estrazione a partire da 200 µl di campione ed eluire con 20-50 µl di TE o tampone di eluizione.

- b) Estrazione del DNA mediante COBAS 4800 (Roche Diagnostics): seguire le istruzioni del produttore.
- c) Estrazione del DNA mediante QiaCube (Qiagen): seguire le istruzioni del produttore.

Se i campioni di DNA verranno analizzati in breve tempo, conservarli a 2-8 °C; per una conservazione prolungata mantenerli a -20 °C.

SOSTANZE INTERFERENTI

I campioni cervicali che possono contenere sostanze interferenti che sono note come inibitori della reazione i PCR. Queste sostanze includono: sangue intero (umano), leucociti, contraccettivi e prodotti per igiene femminile, come gelatine contraccettive, creme antimicotiche, spermicidi, lubrificanti vaginali, etc.

La maggior parte di queste sostanze interferenti viene eliminata durante il processo di estrazione del DNA. Un campione di DNA in cui sono presenti inibitori, verrà identificato dall'assenza di amplificazione dei geni di controllo amplificati durante la reazione di PCR.

PROCEDURA STD PANEL STRIP

1.- Reazione a catena della polimerasi

Preparazione delle PCR

Importante: prima di aprire i flaconi con i reagenti PCR, centrifugare brevemente. Questo assicurerà che tutto il contenuto sarà al fondo del flacone.

Con ogni campione di DNA saranno eseguite due reazioni di PCR (A e B): una utilizzando i primer A (flaconcino con tappo blu) e l'altra utilizzando i primer B (flaconcino con tappo bianco). I reagenti Premix per PCR e Taq sono comuni a entrambe le reazioni.

- Preparare le provette per PCR necessarie in base al numero di campioni di DNA da amplificare (2 per DNA).
- Aggiungere in ciascuna provetta per PCR: 39 µl di premix di PCR + 5 µl di primer (A o B) + 1 µl di Taq + 5 µl di ADN. Mescolare bene. Se possibile, mantenere i reagenti e le mix a 2-8 °C durante la preparazione.

In caso di amplificazione di più campioni di DNA, si consiglia di preparare una mix comune contenente tutti i reagenti, in modo da aggiungere poi 45 µl di mix + 5 µl di DNA. Ad esempio:

| N° di PCR | Premix di PCR | Primer | Taq |
|-----------|---------------|---------|--------|
| 1 | 39 µl | 5 µl | 1 µl |
| 3 | 136,5 µl | 17,5 µl | 3,5 µl |
| 5 | 214,5 µl | 27,5 µl | 5,5 µl |
| 8 | 351 µl | 45 µl | 9 µl |

- Le mix contenenti tutti i reagenti per la PCR devono essere preparate sempre in eccesso, per compensare le perdite di volume che si verificano durante la pipettatura.

Secondo la buona pratica di laboratorio, l'utente deve inoltre amplificare un controllo negativo (acqua o tampone TE, per esempio) e, se necessario, un controllo positivo (non incluso nel kit).

Amplificazione

Considerate l'importanza di ottenere una adeguata concentrazione del DNA per ottenere un risultato corretto.

Inserire le provette nel termociclatore (se necessario, aggiungere 1 goccia di olio Nujol su ogni reazione di PCR) e amplificare il DNA con il seguente programma:

94 °C, 5 min
40 cicli di: 94 °C, 15 seg
57 °C, 1 min 30 seg
72 °C, 45 seg
72 °C, 5 min
4 °C

→ Vedere le schema di preparazione della PCR nell'allegato

Una volta terminata la PCR, continuare con lo sviluppo della striscia. Se i campioni non vengono analizzati immediatamente, conservarli a 2-8 °C per non più di 24 ore. In caso di conservazione prolungata, congelarli a -20 °C.

2.- Sviluppo della striscia

Su richiesta, l'azienda fornirà all'utente la procedura di lavoro dipendendo dello strumento che verrà utilizzato per lo sviluppo delle strisce (PST-60HL, Profiblot, Autoblot 3000H, TENDIGO o Dynablot Heat). In alternativa, è possibile consultare il seguente indirizzo web:

<https://operon.es/products-protocols/>

Per ogni campione, miscelare lo stesso volume di PCR A e PCR B (ad esempio, 15 µl + 15 µl) e continuare con la procedura di lavoro per lo strumento specifico da utilizzare. Nel denaturazione fase, **25 µl di denaturazione buffer di + 25 µl di miscela di PCR** verrà erogata nel vassoio.

Il prodotto è stato testato con diverse piattaforme di lavoro. Per vostra informazione si specificano i nomi commerciali delle piattaforme di lavoro utilizzate ma non implica l'uso esclusivo e dipendente di tali marchi commerciale. Il prodotto funziona correttamente durante l'utilizzo di una piattaforma che garantisce il programma di temperatura sollevata per il prodotto.

3.- Interpretazione della striscia

Interpretazione della striscia può essere fatta visivamente, usando il schema per l'interpretazione incluso nel kit (vedere la procedure per ogni strumento) o automaticamente, utilizzando gli scanner BLOTrix R2 o BLOTrix S1 (BioSciTec).

Su richiesta, l'azienda fornirà all'utente le istruzioni per l'interpretazione automatica delle strisce con scanner (DO-09053004 "Instructions of use BLOTrix R2_S1"). In alternativa, è possibile consultare il seguente indirizzo web:

<https://operon.es/products-protocols/>

Importante: l'interpretazione automatica del risultato richiede sempre una verifica visiva delle strisce; bande molto deboli non potrebbero essere rilevate dallo strumento.

RISULTATI

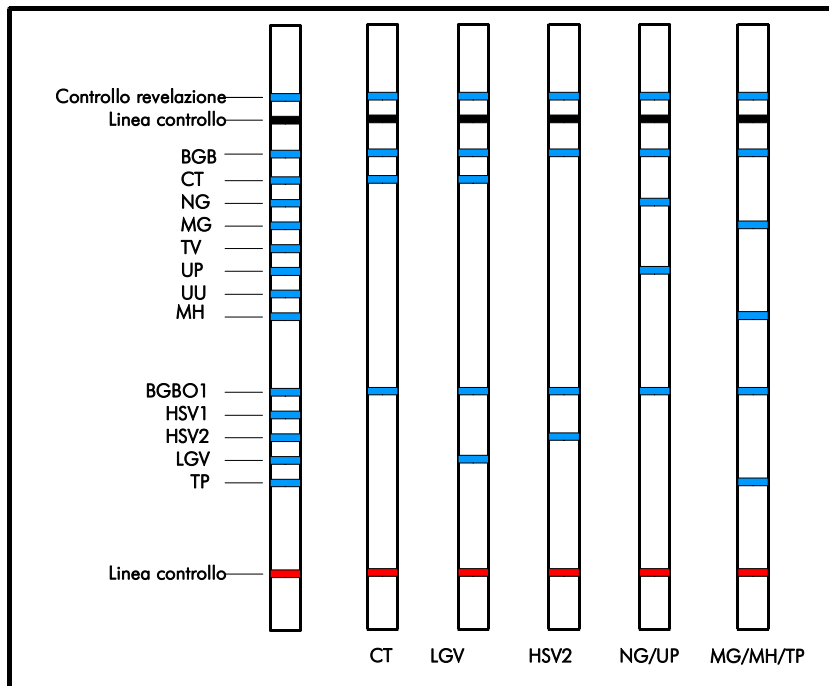
Il kit STD Panel Strip permette il rilevamento e l'identificazione di 10 patogeni associati con malattie sessualmente trasmissibili: *Chlamydia trachomatis* (CT) e sue varianti L1, L2 e L3 qui causa linfogranuloma venereo (LGV), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Mycoplasma genitalium* (MG), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Ureaplasma parvum* (UP), *Ureaplasma urealyticum* (UU), *Mycoplasma hominis* (MH), *Herpes simplex 1* (HSV1), *Herpes simplex 2* (HSV2), e *Treponema pallidum* (TP).

Un campione di DNA potrà dare come risultato:

1. Solo le bande di controllo (BGB and BGBO1): nessuno dei patogeni rilevabili con il kit è presente o ha potuto essere amplificato.
2. La banda di controllo e una banda associata a un determinato patogeno: campione positivo per quel determinato patogeno.
3. La banda di controllo e varie bande associate a diversi patogeni: campione positivo con infezione multipla.

4. Una o più bande associate a diversi patogeni: campione positivo per quei patogeni in cui i geni di controllo non si amplificano. Questo può accadere, per esempio, quando il campione ha una elevata concentrazione in copie, o è positivo per più agenti patogeni, poichè le condizioni di PCR sono state ottimizzate per favorire l'amplificazione del DNA del patogeno rispetto a quella dei controlli interni. La presenza di bande di controllo è obbligatoria in caso di un campione negativo, mentre può essere assente nel caso di un campione positivo.

Esempi di genotipizzazione utilizzando la striscia STD Panel Strip



Attenzione: nel caso del linfogranuloma venereo (LGV), trattandosi di una variante di *Chlamydia trachomatis*, compariranno le bande associate a *C. trachomatis* insieme a quelle relative al LGV.

CONTROLLO DI QUALITÀ

La linea di controllo della rivelazione deve comparire sempre al di sopra della linea nera superiore. La sua eventuale assenza indicherà un problema nella fase di ibridazione/rivelazione del prodotto.

La striscia corrispondente al controllo di amplificazione negativo mostrerà soltanto la banda di controllo di rivelazione.

Nel caso di campioni negativi, è necessario che sia presente la banda associata al controllo interno (BGB and BGBO1) per comprovare l'effettiva negatività. L'assenza di questa banda in un campione negativo indica che durante la PCR l'amplificazione non è avvenuta. Ciò può essere causato dalla mancanza di DNA (misurare la concentrazione), dalla sua degradazione o dalla presenza di inibitori della PCR nel DNA (emoglobina, resti di sali, ecc.).

PRESTAZIONI / VALUTAZIONI INTERNE ED ESTERNE

Questo test deve essere utilizzato esclusivamente da professionisti qualificati e familiarizzati con i metodi di biologia molecolare.

Il funzionamento del test è stato comprovato con numerosi campioni di DNA provenienti da origine diversa in diverse valutazioni mostrate di seguito. I primi 10 valutazioni sono state effettuate presso le sedi dei Operon, S.A., mentre la valutazione n° 11 ha avuto luogo nei locali del Centro de Análisis Genético (CITOGEN, Zaragoza, Spagna). Tutti i kit commerciali utilizzati sono marcati CE.

Valutazione n° 1

Sono state analizzate la sensibilità e la specificità di rilevamento di *Trichomonas vaginalis* con 77 campioni di DNA estratti da tamponi cervico-vaginali precedentemente valutati mediante analisi a fresco con microscopia ottica e conferma mediante coltura in terreno specifico (Reparto di Microbiologia, Ospedale Universitario di Saragozza). L'estrazione dei campioni di DNA è stata effettuata con il DNA Mini Kit (Qiagen).

La concordanza tra i metodi in termini di sensibilità e specificità è stata, rispettivamente, del 100% e del 94,4%. Dei 18 campioni risultati negativi mediante microscopia/coltura, uno ha fornito un risultato positivo con il kit STD Panel Strip; la positività è stata confermata mediante analisi per PCR di due regioni geniche alternative del protozoo.

Valutazione n° 2

Sono state analizzate la sensibilità e la specificità di rilevamento di *Chlamydia trachomatis*, sierotipi L1, L2 e L3, responsabili del linfogranuloma venereo. Per la sensibilità, sono stati utilizzati 10 campioni di DNA precedentemente valutati mediante PCR Real Time (procedure di routine eseguite presso l'Ospedale Miguel Servet a Saragozza, l'Ospedale Universitario di Donostia a San Sebastián e l'Ospedale Valme a Siviglia). Per la specificità, sono stati utilizzati 13 campioni di DNA estratti con il sistema Qiacube di Qiagen e valutati con il kit RealCycler THLV (Progenie).

La concordanza ottenuta tra i metodi in termini di sensibilità e specificità è stata del 100%.

Valutazione n° 3

Sono state analizzate la sensibilità e la specificità di rilevamento di *Treponema pallidum* con 13 campioni di DNA (2 positivi e 11 negativi) estratti con il sistema Qiacube di Qiagen e valutati con il kit RealCycler THLV (Progenie).

La concordanza ottenuta tra i metodi in termini di sensibilità e specificità è stata del 100%.

Valutazione n° 4

Sono state analizzate la sensibilità e la specificità di rilevamento di HSV1 con 24 campioni di DNA (15 positivi e 9 negativi) estratti con il sistema Qiacube di Qiagen e valutati con il kit Fluorotype HSV (Hain).

La concordanza ottenuta tra i metodi in termini di sensibilità e specificità è stata del 100%.

Inoltre, sono state analizzate la sensibilità e la specificità di rilevamento di HSV1 con 68 campioni (28 positivi e 40 negativi) estratti con la piattaforma COBAS 4800 e valutati con il kit LightCycler HSV1/2 Qual kit (Roche).

La concordanza ottenuta tra i metodi in termini di sensibilità e specificità è stata, rispettivamente, del 96,4% e del 100%. È stato rilevato un unico falso negativo con il kit STD Panel Strip, che corrispondeva a un campione con un Ct pari a 40 con il kit LightCycler HSV1/2 (Roche).

Valutazione n° 5

Sono state analizzate la sensibilità e la specificità di rilevamento di HSV2 con 24 campioni di DNA (9 positivi e 15 negativi) estratti con il sistema Qiacube di Qiagen e valutati con il kit Fluorotype HSV (Hain).

La concordanza ottenuta tra i metodi in termini di sensibilità e specificità è stata, rispettivamente, dell'88,9% e del 100%. Un campione positivo ha fornito un risultato negativo per HSV2 con il kit STD Panel Strip, ma positivo per *Treponema pallidum* (confermato con il kit RealCycler THLV di Progenie).

Inoltre, sono state analizzate la sensibilità e la specificità di rilevamento di HSV1 con 68 campioni (40 positivi e 28 negativi) estratti con la piattaforma COBAS 4800 e valutati con il kit LightCycler HSV1/2 Qual kit (Roche).

La concordanza ottenuta tra i metodi in termini di sensibilità e specificità è stata, rispettivamente, del 97,5% e del 100%. È stato rilevato un unico falso negativo con il kit STD Panel Strip, che corrispondeva a un campione con un Ct pari a 42,5 con il kit LightCycler HSV1/2 (Roche).

Valutazione n° 6

Sono state analizzate la sensibilità e la specificità di rilevamento di *Chlamydia trachomatis* con 197 campioni di DNA (55 positivi e 142 negativi) estratti con il sistema Qiacube di Qiagen e valutati con il kit Dx CT/NG/MG Assay (BioRad).

La concordanza ottenuta tra i metodi in termini di sensibilità e specificità è stata, rispettivamente, del 100% e del 99,3%. Un campione negativo ha fornito un risultato positivo per CT con il kit STD Panel Strip.

Inoltre, è stata analizzata la sensibilità di rilevamento di *Chlamydia trachomatis* con 50 campioni positivi estratti con la piattaforma COBAS 4800 e valutati con il kit CT/NG Cobas 4800 (Roche).

La concordanza ottenuta tra i metodi in termini di sensibilità è stata del 100%.

Valutazione n° 7

Sono state analizzate la sensibilità e la specificità di rilevamento di *Neisseria gonorrhoeae* con 193 campioni di DNA (76 positivi e 117 negativi) estratti con il sistema Qiacube di Qiagen e valutati con il kit Dx CT/NG/MG Assay (BioRad).

La concordanza ottenuta tra i metodi in termini di sensibilità e specificità è stata, rispettivamente, del 98,7% e del 100%. Un campione positivo ha fornito un risultato negativo per NG con il kit STD Panel Strip; il campione è risultato negativo anche con il kit NG OligoGen (Operon).

Inoltre, è stata analizzata la sensibilità di rilevamento di *Chlamydia trachomatis* con 50 campioni positivi estratti con la piattaforma COBAS 4800 e valutati con il kit CT/NG Cobas 4800 (Roche).

La concordanza ottenuta tra i metodi in termini di sensibilità è stata del 100%.

Valutazione n° 8

Sono state analizzate la sensibilità e la specificità di rilevamento di *Mycoplasma genitalium* con 193 campioni di DNA (86 positivi e 107 negativi) estratti con il sistema Qiacube di Qiagen e valutati con il kit Dx CT/NG/MG Assay (BioRad).

La concordanza ottenuta tra i metodi in termini di sensibilità e specificità è stata, rispettivamente, del 94,2% e del 100%.

Valutazione n° 9

È stata analizzata la sensibilità di rilevamento di *Ureaplasma spp* (*Ureaplasma parvum* + *Ureaplasma urealyticum*) con 31 campioni di tamponi di essudato cervico-vaginale conservati in terreno di Amies-Stuart. Tali campioni erano stati precedentemente valutati con il kit Mycoplasma IST 2 (BioMerieux) e 30 di essi erano risultati positivi e 1 negativo. L'estrazione del DNA dai tamponi è stata effettuata con il kit DNA Mini Kit (Qiagen).

La concordanza ottenuta tra i metodi in termini di sensibilità è stata del 96,7%. Uno dei campioni risultati positivi con il kit Mycoplasma IST 2 è risultato negativo per *Ureaplasma* con il kit STD Panel Strip, ma positivo per *Mycoplasma hominis*. L'analisi del campione mediante tre PCR individuali le cui sequenze bersaglio erano regioni diverse del gene dell'ureasi ha fornito anch'essa un risultato negativo per *Ureaplasma*.

L'unico campione negativo dello studio ha fornito un risultato positivo con il kit STD Panel Strip. Dal momento che nello studio vi era un solo campione negativo, non è stato possibile valutare la concordanza di specificità, però è importante segnalare che il kit Mycoplasma IST 2 fornisce un segnale positivo soltanto per conte superiori a 1000 UCC/ml, mentre il kit STD Panel Strip non presenta questa limitazione. Il campione positivo è stato confermato mediante PCR individuali di tre regioni diverse del gene dell'ureasi di *Ureaplasma*.

Inoltre, sono state analizzate la sensibilità e la specificità di rilevamento di *Ureaplasma spp* (*Ureaplasma parvum* + *Ureaplasma urealyticum*) con 64 campioni di tamponi di essudato cervico-vaginale conservati in terreno di Amies-Stuart. Tali campioni erano stati precedentemente valutati con il kit Mycoview (Zeacon Diagnostics) e 49 di essi erano risultati positivi e 15 negativi. L'estrazione del DNA dai tamponi è stata effettuata con il kit DNA Mini Kit (Qiagen).

La concordanza ottenuta tra i metodi in termini di sensibilità e specificità è stata, rispettivamente, del 92% e del 73,3%. Tre dei campioni risultati positivi con il kit Mycoview sono risultati negativi per *Ureaplasma* con il kit STD Panel Strip. L'analisi di tali campioni mediante tre PCR individuali le cui

sequenze bersaglio erano regioni diverse del gene dell'ureasi ha fornito anch'essa un risultato negativo per *Ureaplasma* in tutti i casi.

Dei 15 campioni negativi dello studio, quattro hanno fornito un risultato positivo con il kit STD Panel Strip. I quattro campioni positivi sono stati confermati mediante PCR individuali di tre regioni diverse del gene dell'ureasi di *Ureaplasma*. Occorre segnalare che il kit Mycoview, al pari del kit Mycoplasma IST2, fornisce un segnale positivo soltanto per conte superiori a 1000 UCC/ml, mentre il kit STD Panel Strip non presenta questa limitazione.

Valutazione n° 10

Sono state analizzate la sensibilità e la specificità di rilevamento di *Mycoplasma hominis* con 32 campioni di tamponi di essudato cervico-vaginale conservati in terreno di Amies-Stuart. Tali campioni erano stati precedentemente valutati con il kit Mycoplasma IST 2 (BioMerieux) e 2 di essi erano risultati positivi e 30 negativi. L'estrazione del DNA dai tamponi è stata effettuata con il kit DNA Mini Kit (Qiagen).

La concordanza ottenuta tra i metodi in termini di sensibilità e specificità è stata, rispettivamente, del 50% e del 70%. Dei due campioni risultati positivi con il kit Mycoplasma IST 2, uno è risultato negativo con il kit STD Panel Strip, ma positivo per *Ureaplasma parvum*. La positività è stata confermata mediante PCR individuali di tre regioni diverse del gene dell'ureasi di *Ureaplasma*. Dei 30 campioni negativi, 9 sono risultati positivi per *Mycoplasma hominis* con il kit STD Panel Strip. La positività di questi 9 campioni è stata confermata mediante una PCR individuale alternativa per *Mycoplasma hominis* e ibridazione con una sonda specifica. Come nel caso di *Ureaplasma spp*, il kit Mycoplasma IST 2 fornisce un segnale positivo per *Mycoplasma hominis* soltanto per conte superiori a 1000 UCC/ml.

Inoltre, sono state analizzate la sensibilità e la specificità di rilevamento di *Mycoplasma hominis* con 64 campioni di tamponi di essudato cervico-vaginale conservati in terreno di Amies-Stuart. Tali campioni erano stati precedentemente valutati con il kit Mycoview (Zeacon Diagnostics) e 19 di essi erano risultati positivi e 45 negativi. L'estrazione del DNA dai tamponi è stata effettuata con il kit DNA Mini Kit (Qiagen).

La concordanza ottenuta tra i metodi in termini di sensibilità e specificità è stata, rispettivamente, del 57,9% e del 97,8%. Dei 19 campioni risultati positivi con il kit Mycoview, 8 sono risultati negativi con il kit STD Panel Strip; tutti questi campioni hanno fornito un risultato positivo per *Ureaplasma*. La negatività di questi campioni è stata confermata mediante una PCR alternativa per *M. hominis*, mentre la positività per *Ureaplasma* è stata confermata mediante PCR individuali di tre regioni diverse del gene dell'ureasi di *Ureaplasma spp*. Dei 45 campioni negativi, uno è risultato positivo per *Mycoplasma hominis* con il kit STD Panel Strip; il risultato di tale campione è stato confermato mediante una PCR individuale alternativa per *Mycoplasma hominis* e ibridazione con sonde specifiche. Al pari del kit Mycoplasma IST2, il kit Mycoview fornisce un risultato positivo per *M. hominis* soltanto per conte superiori a 1000 UCC/ml.

La concordanza di sensibilità per *M. hominis* eseguendo un confronto con il kit Mycoplasma IST2 (50%) o Mycoview (57,9%) è molto bassa. Questi kit sfruttano le proprietà biochimiche degli ureaplasmi e dei micoplasmi e si basano sull'osservazione di un cambiamento di colore del terreno da giallo a porpora nel caso in cui si verifichi la metabolizzazione dell'urea (*Ureaplasma spp*) o dell'arginina (*Mycoplasma hominis*).

Esistono pubblicazioni che indicano che questi test presentano un problema di falsa positività, soprattutto per quanto riguarda *M. hominis*. In una di queste (Biernat-Sudolska M.), è stata eseguita un'analisi di un totale di 5715 campioni; di questi, 240 hanno fornito un risultato positivo per *M. hominis* ed è stato confermato un totale di 176 falsi positivi. In tutti i casi, è stata dimostrata la presenza di ureaplasmi con un titolo >10000 CFU/ml (come avviene nel nostro studio).

Valutazione n° 11

La sensibilità e la specificità di STD Panel Strip per la rilevazione di diversi microrganismi rilevati è stato confrontato con i kit del pannello CLART STIsA / STIsB (Genomica). Per questo, un totale di 81 campioni di DNA isolati da striscio di diversa origine (endocervicale, vaginale, uretrale, della faringe,

retto) con il DNA Mini Kit Kit (Qiagen) sono stati valutati con entrambi i kit. I risultati ottenuti sono riportati nella seguente tabella:

| Accordo finale tra i metodi di microrganismi | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------------------|------|------|-----|-----|------|------|------|------|------|------|-----|
| | CT | NG | MG | TV | UP | UU | MH | HSV1 | HSV2 | LGV | TP |
| Sensibilità | 100 | 94,1 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | NA | 100 |
| Specificità | 96,8 | 100 | 100 | 100 | 89,6 | 88,6 | 95,9 | 100 | 98,5 | 98,8 | 100 |

Tutti i campioni discordanti sono stati confermati per STD Panel Kit Strip.

POSSIBILI PROBLEMI

1. Sulla striscia non compare alcuna banda, nemmeno quella di controllo.

- Non si è atteso che il coniugato e/o il rivelatore raggiungessero la temperatura ambiente.
- Il coniugato e/o il rivelatore non sono stati aggiunti o sono stati aggiunti in quantità insufficiente.

2. Compare solo la linea della sonda di controllo.

- Errore di amplificazione nella PCR (eseguire un controllo su gel di agarosio).
- Durante la fase di ibridazione il prodotto di PCR non è stato aggiunto o è stato aggiunto in quantità insufficiente.
- Temperatura non corretta del tampone di ibridazione/lavaggio 1 (superiore a quella indicata).
- Temperatura non corretta dell'incubatore (superiore a quella indicata).

3. Forte colore di fondo sulla striscia dopo la fase di rivelazione.

- La procedura di lavaggio non è stata eseguita correttamente (durata troppo breve, quantità di tampone insufficiente, tamponi freddi).

4. Colorazione non omogenea della striscia

- Agitazione inadeguata (controllare la programmazione del termomixer per piastre).
- Le strisce non sono rimaste completamente sommerse durante le incubazioni.

5. Risultati inattesi

- Temperatura di incubazione e/o dei tamponi/reagenti non corretta
- Contaminazione nelle PCR (verificare con un controllo negativo).
- Contaminazione di canali adiacenti dovuta al passaggio di liquido da un canale all'altro durante l'aggiunta del tampone di ibridazione.

La temperatura appropriata per l'esecuzione della procedura di ibridazione/rivelazione è di 42 °C. Tra 39 e 42 °C il test ha dimostrato un funzionamento simile, senza comparsa di reazioni aspecifiche; temperature superiori a 43 °C possono determinare una lieve riduzione dell'intensità delle bande e della sensibilità del kit.

SENSIBILITÀ

Si definisce **limite di rivelabilità** del kit la quantità minima di DNA/RNA rilevabile con il test.

Si definisce **limite di prova** la quantità minima di DNA/RNA con la quale è sempre possibile eseguire la genotipizzazione o che viene sempre rilevata con il test.

Entrambi i limiti sono stati determinati per ciascuno dei patogeni rilevabili con il kit STD Panel Strip. A tal fine, sono state analizzate diluizioni seriali 1/10 del DNA di ciascuno di essi con tre lotti diversi del prodotto.

I risultati di sensibilità ottenuti sono riportati nella tabella seguente:

| | Limite di rivelabilità | Limite di prova |
|------|------------------------|-----------------|
| CT | 1 copia | 3 copie |
| NG | 2 copie | 6 copie |
| MG | 0,00000128 ng | 0,000032 ng |
| TV | 1 copia | 3 copie |
| UU | 0,000032 ng | 0,00016 ng |
| MH | 0,000032 ng | 0,00016 ng |
| HSV1 | 6 copie | 12 copie |
| HSV2 | 2 copie | 6 copie |
| LGV | 12 copie | 12 copie |
| TP | 3 copie | 6 copie |

SPECIFICITÀ

Attraverso l'analisi di un gran numero di campioni negativi (vedi punto 7.5) possiamo escludere la presenza di reazioni crociate con la normale flora batterica del tratto urogenitale. In questo gruppo di microrganismi sono inclusi: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Mycoplasma*, *atopobium*, *Peptococcus*, *Petostreptococcus*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella*.

In ogni caso, la specificità del kit è stata valutata analizzando il DNA dei microrganismi più frequentemente associati con malattie del tratto urogenitale. Inoltre, abbiamo incluso nello studio anche il batterio *C. psittaci*, a causa della sua omologia genetica con il gene *Omp* della *C. trachomatis*.

E' stata dimostrata assenza di cross-reazione con i seguenti agenti patogeni:

| Microorganismo | Typo | Quantità in PCR | Risultato |
|---------------------------------------|-----------------------------------|-----------------|-------------------------------|
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | 434 Strain, ATCC, LGVII | 66500 copie | <i>C. trachomatis</i> |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | Campione clinico isolato | 72500 copie | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> |
| <i>Mycoplasma genitalium</i> | NCTC10195 | 0,5 ng | <i>Mycoplasma genitalium</i> |
| <i>Trichomonas vaginalis</i> | Campione clinico isolato | 74000 copie | <i>Trichomonas vaginalis</i> |
| <i>Ureaplasma urealyticum</i> | NCTC 010112 | 0,5 ng | <i>Ureaplasma urealyticum</i> |
| <i>Mycoplasma hominis</i> | NCTC 10111 | 0,5 ng | <i>Mycoplasma hominis</i> |
| <i>Herpes simplex 1</i> | MacIntyre Strain (ATCC VR-539) | 90000 copie | <i>Herpes simplex 1</i> |
| <i>Herpes simplex 2</i> | MS Strain (ATCC VR-540) | 80000 copie | <i>Herpes simplex 2</i> |
| <i>Treponema pallidum</i> | Nichols Strain | 3500 copie | <i>Treponema pallidum</i> |
| <i>E.coli</i> | JM109 Strain | 88 ng | Negativo |
| <i>Haemophilus ducreyi</i> | NC10945 | 90 ng | Negativo |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | Stableforth G19 Strain (CECT 183) | 27400 copie | Negativo |
| <i>Staphylococcus Aureus mecA (-)</i> | Subspecies Aureus (CECT 239) | 15 ng | Negativo |
| <i>Candida albicans</i> | NCPI 3152 Strain (UKNCC) | 100 ng | Negativo |
| <i>Staphylococcus Aureus mecA (+)</i> | Subspecies Aureus (N° 13661) | 95,6 ng | Negativo |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | Sierotipo B. NCTC 1026. | 37200 copie | Negativo |

| Microorganismo | Typo | Quantità in PCR | Risultato |
|--------------------------------|----------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>Gardnerella vaginalis</i> | ATCC 14018 | 32400 copie | Negativo |
| <i>Chlamydomphila psittaci</i> | Ceppo 6 BC | 30000 copie | Negativo |
| HPV | 6, 11 | 5 ng | Negativo |
| HPV | 16, 18, 31, 39, 51, 53, 56, 58, 59, 82 | Campione clinico isolato | Nessuna reazione crociata |

Nel caso di *T. pallidum*, il kit non distingue il *T. pallidum pallidum* (causa della sifilide) dal *T. pallidum pertuene* e *T. paraluisuniculi*.

T. paraluisuniculi. è un batterio che infetta i conigli . Non vi sono descritte altre zoonosi causate da questo batterio

T. pallidum pertuene infetta l'uomo, soprattutto i maschi sotto i 15 anni di età. Esso è causa di una malattia tropicale chiamata pian, che colpisce la pelle, ossa e cartilagine. Non è una malattia a trasmissione sessuale. Si trasmette per contatto diretto (da persona a persona) attraverso l'essudato delle lesioni di una persona infetta.

HOOK EFFECT

Sono state analizzate quantità crescenti di DNA di ogni patogeno identificato con il kit, senza che sia stata osservata inibizione del segnale o comparsa di reazioni crociate che potessero essere associate all'esistenza di effetto Hook.

Pertanto, non si verifica alcun effetto Hook.

PRECISIONE INTRASAGGIO

La precisione intrasaggio di STD Panel Strip è stata studiata mediante l'analisi di, da un lato, 5 curve di sensibilità (diluizioni di un DNA di controllo composto da una mistura di DNA di patogeni rilevabili con il kit) e, dall'altro, cinque replicati di 7 campioni di DNA positivi per diversi patogeni.

In generale, il kit STD Panel Strip ha dimostrato una buona precisione intrasaggio, ottenendo lo stesso siero tipizzazione dei campioni e una sensibilità simile.

PRECISIONE INTERGIORNALIERA

La precisione intergiornaliera di STD Panel Strip è stata studiata mediante l'analisi, da un lato, di un curve di sensibilità (diluizioni di un DNA di controllo composto da una mistura di DNA di patogeni rilevabili con il kit) e, dall'altro, di 8 campioni di DNA. Ogni curva di sensibilità è stata eseguita da una stessa persona, utilizzando lo stesso lotto di prodotto e in cinque giorni consecutivi.

In generale, il kit STD Panel Strip ha dimostrato una buona precisione intergiornaliera, ottenendo lo stesso siero tipizzazione dei campioni e una sensibilità simile.

PRECISIONE INTERLABORATORIO

La precisione interlaboratorio è stata studiata mediante l'analisi di 7 campioni di DNA, in duplice. Ogni analisi è stata realizzata da una persona diversa, nello stesso giorno e utilizzando lo stesso lotto di prodotto. Per variare la maggior parte delle condizioni di utilizzo del kit, ciascun operatore utilizzato un ciclatore termico e diverso termostatico.

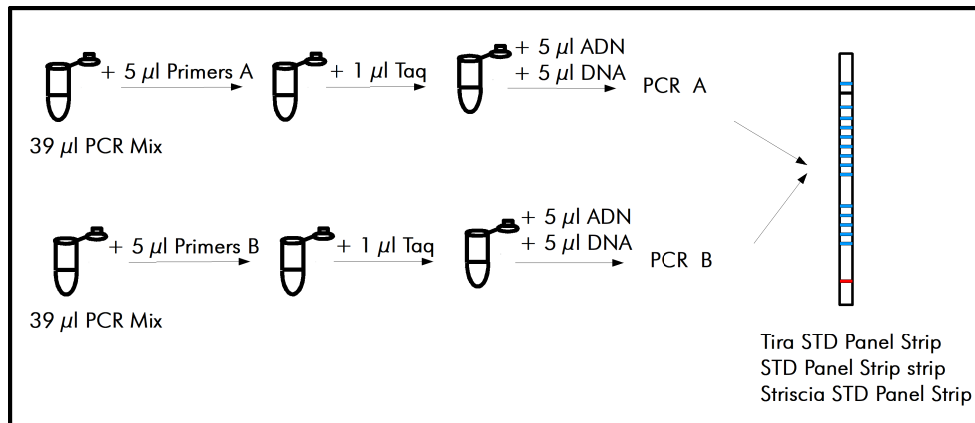
In generale, il kit STD Panel Strip ha dimostrato una buona precisione interlaboratorio, ottenendo lo stesso siero tipizzazione dei campioni e una sensibilità simile.

PRECISIONE INTERLOTTO

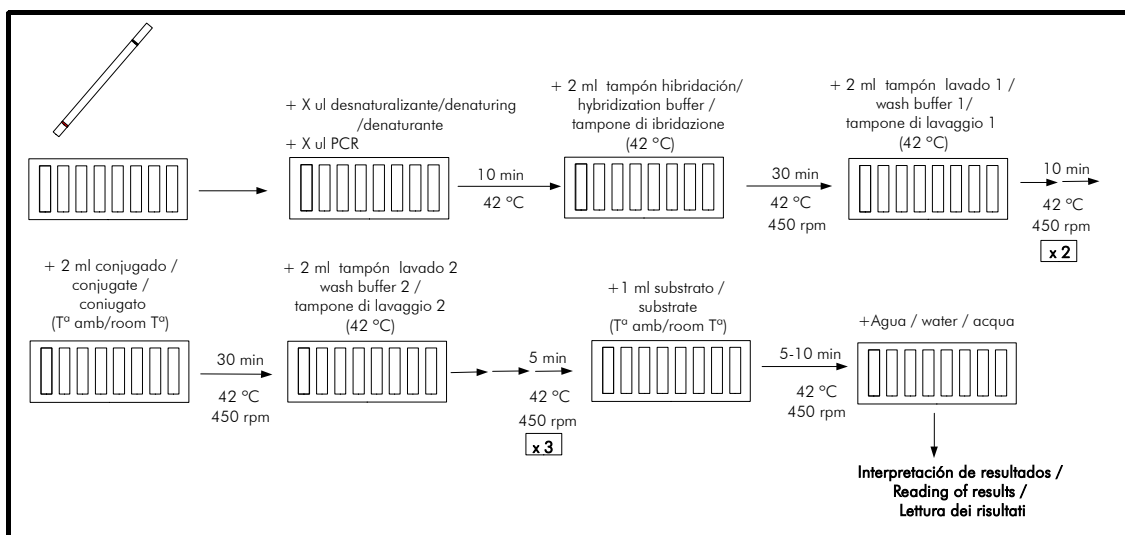
La precisione interlotto del kit STD Panel Strip è stata studiata mediante l'analisi di, da un lato, un curve di sensibilità (diluizioni di un DNA di controllo composto da una mistura di DNA di patogeni rilevabili con il kit) e, dall'altro, di 52 campioni di DNA.

In generale, il kit STD Panel Strip ha dimostrato una buona precisione interlotto, ottenendo lo stesso siero tipizzazione dei campioni e una sensibilità simile.

Esquema de preparación de PCR / PCR preparation diagram / Schema di preparazione della PCR



Desarrollo de la tira / Strip developing diagram / Sviluppo della striscia



BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY/BIBLIOGRAFIA

1. Biernat-Sudolska M., "The need to verify of positive *Mycoplasma hominis* results obtained using the Mycoplasma IST2 tests". *Journal of Laboratory Diagnostics* (2013), vol 49, pags 5-8.
2. Domeika M. et al. "Guidelines for the laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections in East European countries". *JEADV* (2009). 23: 1353-1363.
3. Seth-Smith H.MB. et al. " Co-evolution of genomes and plasmids within *Chlamydia trachomatis* and the emergence in Sweden of a new varaint strain". *BMC Genomics* (2009), vol 10, pags 239-249.
4. Sokolovskiy E. et al. "Guidelines for the laboratory diagnosis fo syphilis in East European countries". *JEADV* (2009). 23: 623-632.
5. Domeika M et al. "Guidelines for the laboratory diagnosis of trichomoniasis in East European countries". *JEADV* (2010). 24: 1125-1134.
6. Shipitsyna E. "Guidelines for the laboratory diagnosis of *Mycoplasma genitalium* infections in East European Countries". *Acta Derm. Venereol.* (2010). 90: 461-467.
7. Savicheva A. et al. "Guidelines for laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* in East-European countries". *Acta Medica Lituanica* (2007). 14: 65-74.
8. Domeika M. et al. "Guidelines for the laboratory diagnosis of genital herpes in eastern European countries". www.eurosurveillance.org.
9. Xiao L. eta al. "Detection and characterization of human *Ureaplasma* species and serovars by Real-Time PCR". *Journal of Clinical Microbiology* (2010). 48 (8): 2715-2723.



Fecha de caducidad / Expiration date / Data di scadenza



Número de lote / Lot number / Numero di lotto



Uso diagnóstico in vitro / For in vitro diagnostic use / Per uso diagnostico in vitro



Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/EC sobre los productos sanitarios para diagnóstico invitro / This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical device / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE relativa a dispositivi medico-diagnostici in vitro.



Número de catálogo / Catalogue number / Numero di catalogo



Leer instrucciones de uso / Please read pack inserts / Leggere le istruzioni d'uso



Fabricado por / Manufactured by / Prodotto da



Contenido suficiente para <n> ensayos / Contents sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per <n> saggi



Conservar a / Store at / Conservare a



Precaución / Caution / Precauzione



Reactivo corrosivo / Corrosive reagent / Reagente corrosivo



DO-09051028 Rev. 3 (25-10-2018)

OPERON, S.A. - Camino del Plano, 19 - E-50410 Cuarte de Huerva - (Zaragoza) – SPAIN