

RIDA® GENE *Trichomonas vaginalis*

REF PG4975



Deutsch	3
English.....	19
Español.....	35
Français.....	51
Italiano.....	67

RIDA®GENE *Trichomonas vaginalis*

REF PG4975

1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA®GENE *Trichomonas vaginalis* ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis von *Trichomonas vaginalis* aus humanen Genitalabstrichen und Urin.

Die RIDA®GENE *Trichomonas vaginalis* real-time PCR soll die Diagnose einer durch *Trichomonas vaginalis* verursachten Trichomoniasis unterstützen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Trichomonas vaginalis ist ein humanpathogener Parasit, der im Genitalbereich des Menschen vorkommt. *Trichomonas vaginalis* führt zu einer Trichomoniasis wobei sowohl die Geschlechtsorgane als auch die Harnwege betroffen sind. Trichomoniasis wird während dem Geschlechtsverkehr entweder durch Vaginal-Flüssigkeit oder Sperma übertragen, so dass sowohl Männer als auch Frauen betroffen sein können. Weltweit werden jährlich 120 Millionen Fälle beschrieben, wobei eine höhere Prävalenz in Frauen bekannt ist.¹

Laut dem Centers of Disease Control and Prevention (CDC) sind in den USA etwa 3,7 Millionen Menschen mit *Trichomonas vaginalis* infiziert, jedoch zeigen nur 30 % der Infizierten Symptome.² Die Symptome reichen von Brennen im Vaginalbereich und Wasserlassen bis hin zu eitrigem Ausfluss. Während einer Infektion mit *Trichomonas vaginalis* bei Frauen wird häufig auch eine Fehlbesiedelung der Scheidenflora mit anderen Erregern beobachtet. So sind *Gardnerella vaginalis* und verschiedene Stuhlbakterien oft Begleiter einer Trichomonadeninfektion. Bei schwangeren Frauen kann eine *Trichomonas vaginalis*-Infektion zudem zu weiteren Komplikationen wie Frühgeburt oder vorzeitigem Blasensprung führen. Komplikationen bei Männern sind u.a. Infertilität und Prostatitis.³ Neben der Fehlbesiedelung der Scheidenflora ist *Trichomonas vaginalis* auch ein sehr wichtiger Kofaktor bei der Übertragung von HIV.² Der Goldstandard in der Diagnose ist nach wie vor die Kultur, jedoch zeigt diese nur eine Sensitivität von 80 % und ist mit einer Dauer von bis zu 7 Tagen für eine zeitnahe Diagnose ungeeignet.

3. Testprinzip

RIDA[®]GENE *Trichomonas vaginalis* ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis von *Trichomonas vaginalis* aus humanen Genitalabstrichen und Urin. Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente von *Trichomonas vaginalis* amplifiziert (ITS1).

Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die Taq-Polymerase den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA[®]GENE *Trichomonas vaginalis* Test enthält eine Internal Control DNA (ICD), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR Inhibition kontrollieren zu können.

4. Packungsinhalt

Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen.)

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	gelb
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rot
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	weiß
P	Positive Control	1x	200 µl	blau

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 5 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA® GENE Trichomonas vaginalis multiplex real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR-Geräten:

Tab.2: Benötigtes Zubehör

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
bioMérieux	NucliSENS easy® MAG™
Real-time PCR-Geräte	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR-Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter mdx@r-biopharm.de.

- Sterile, medienfreie Rayon oder Nylon beflockte Abstrichtupfer (z.B. Copan Diagnostic Inc., Katalognummer 155C oder 552C)
- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II
- RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) bei Verwendung des LightCycler® 2.0
- Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (BioScience-Grade, Nuklease-freies, DEPC-behandeltes Wasser)

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter www.r-biopharm.com.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation aus trockenen Genitalabstrichen wird ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionskit (z.B. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell[®] RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Es wird empfohlen für die trockenen Genitalabstriche **400 µl PCR-Wasser** in ein Präparationsröhrchen vorzulegen. Den Abstrichtupfer in das Wasser tauchen, ausdrücken und den Stab abbrechen oder abschneiden. Das Präparationsröhrchen dicht verschließen, kurz vortexen und die weitere DNA-Präparation nach Herstellerangabe des DNA-Extraktionskits oder DNA-Extraktionssystems durchführen (**siehe auch Maxwell[®] RSC Kurzanleitung R101**).

Für die DNA-Präparation aus Urin wird ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionskit (z.B. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell[®] RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten (**siehe auch Maxwell[®] RSC Kurzanleitung R100**).

Der RIDA[®]GENE Trichomonas vaginalis Test enthält eine Internal Control DNA, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die Internal Control DNA kann

entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die Internal Control DNA nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der Internal Control DNA dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die Internal Control DNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der Internal Control DNA während der Extraktion eingesetzt werden. Die Internal Control DNA soll dem Proben-Lysispuffer-Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3, Tab. 4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, die **Taq-Polymerase**, die **Positive Control**, die **No Template Control** und die **Internal Control DNA** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 - 8 °C).

Tab. 3: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Tab. 4: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

Negativkontrolle: Je 5 µl **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als **Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.**

Proben: Je 5 µl DNA-Extrakt zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Positivkontrolle: Je 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als **Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control DNA zum PCR-Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.**

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab.8).

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 DNA real-time PCR-Profil

Tab. 5: Real-time PCR-Profil für LightCycler® Serie und Rotor-Gene Q

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
PCR Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 6: Real-time PCR-Profil für Mx3005P, ABI 7500 und CFX96™

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

9.3.2 Universal real-time PCR-Profil

Hinweis: Das Universal real-time PCR-Profil für DNA Tests sollte nur verwendet werden, wenn RIDA®GENE DNA und RIDA®GENE RNA real-time PCR Tests in einem Lauf kombiniert werden.

Tab. 7: Universal real-time PCR-Profil für LightCycler® Serie

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 8: Universal real-time PCR-Profil für Mx3005P, ABI 7500, Rotor-Gene Q und CFX96™

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 9: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 2.0	<i>Trichomonas vaginalis</i>	530	RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) wird benötigt
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Trichomonas vaginalis</i>	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICD	533/580	
ABI 7500	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICD	HEX	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5
	ICD	Yellow	
Bio-Rad CFX96™	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM	-
	ICD	VIC	

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 10, Abb. 1).

Die Positive Control liegt in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 Kopien in jedem PCR Lauf eingesetzt.

Tab. 10: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICD Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA ^{*1}	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

^{*1} Ein Ct-Wert für die ICD ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

Wenn die Positivkontrolle in dem angegebenen Ct-Bereich nicht positiv ist, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

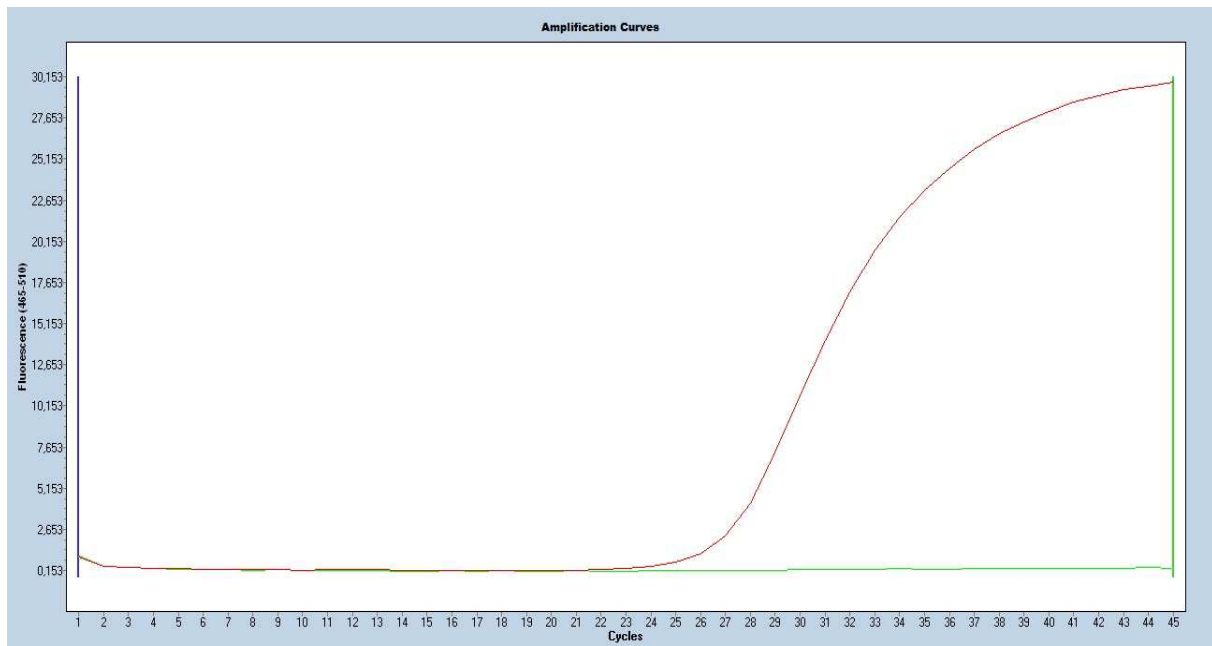


Abb.1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (*Trichomonas vaginalis*) auf dem LightCycler® 480II

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tab. 11.

Tab. 11: Probenauswertung

Zielgen		
<i>T. vaginalis</i>	ICD	Ergebnis
positiv	positiv/negativ	<i>Trichomonas vaginalis</i> nachweisbar
negativ	positiv	Zielgen nicht nachweisbar
negativ	negativ	Ungültig

Trichomonas vaginalis ist nachweisbar, wenn die Proben-DNA und die **Internal Control DNA** eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt.

Trichomonas vaginalis ist ebenfalls nachweisbar, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation, jedoch keine Amplifikation für die **Internal Control DNA** im Nachweissystem zeigt. Der Nachweis der **Internal Control DNA** ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der internen Amplifikationskontrolle führen können.

Trichomonas vaginalis ist nicht nachweisbar, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation, aber die **Internal Control DNA** eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der **Internal Control DNA** ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA im Nachweissystem keine Amplifikation zeigt. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

12. Grenzen der Methode

1. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. Dieser Test ist nur für humane Genitalabstriche und Urin validiert.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®GENE *Trichomonas vaginalis* zu falsch negativen Ergebnissen führen.
6. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro* diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
7. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die Zielgene (ITS1) vorhanden sind.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA[®]GENE *Trichomonas vaginalis* multiplex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 10 DNA-Kopien/Reaktion. Die folgende Abbildung 2 zeigt eine Verdünnungsreihe von *Trichomonas vaginalis* ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II.

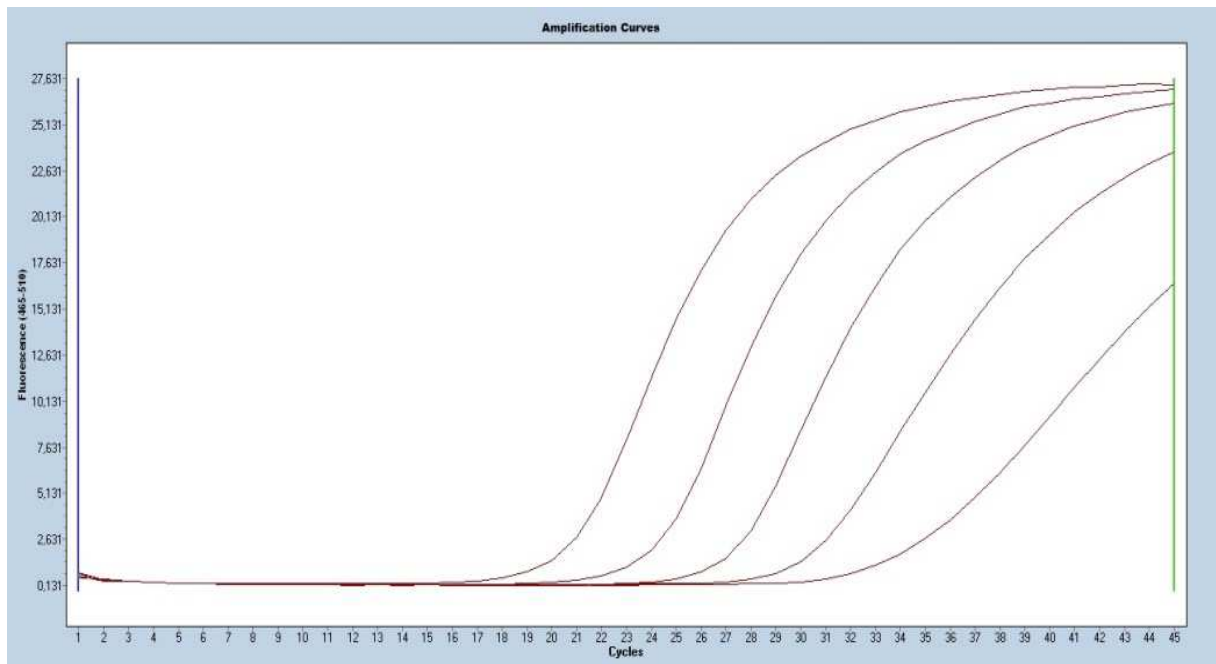


Abb.2: Verdünnungsreihe *Trichomonas vaginalis* ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, DNA-Extraktion und DNA-Gehalt.

13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE Trichomonas vaginalis multiplex real-time PCR ist spezifisch für *Trichomonas vaginalis* aus humanen Genitalabstrichen und Urin. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 12):

Tab. 12: Kreuzreaktivitätstestung










Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-
Adenovirus 7, human, strain Gomen	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone 6	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 40, human, strain Dugan	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 41, human, strain Tak	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	HSV 1	-	Rotavirus	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	HSV 2	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	HPV 6b	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	HPV 16	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Atopobium vaginae</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	HPV 18	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Mobiluncus curtisii</i> subsp. <i>curtisii</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Mycoplasma fermentans</i>	-	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Norovirus GGI	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	Norovirus GGII	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i>	-						

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2014-11-09	Freigabeversion
2018-04-18	Generelle Überarbeitung
2018-04-18	4. Packungsinhalt 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 8. Sammlung und Lagerung der Proben 9. Testdurchführung 13. Leistungsmerkmale 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	<i>In-vitro</i> Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

Nicht zutreffend

16. Literatur

1. Sutton M. *et al.* The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among Reproductive-age women in the United States, 2001-2004. *Clin Infect Disease*, 2007; 45:1319-1326.
2. <https://www.cdc.gov/std/trichomonas/stdfact-trichomoniasis.htm>, aufgerufen am 18.04.2018
3. Soper D. Trichomoniasis. Under Control or Undercontrolled? *Am J Obstet Gynecol*, 2004; 190:281-290.

RIDA[®]GENE *Trichomonas vaginalis*

REF PG4975

1. Intended use

For *in vitro* diagnostic use. RIDA[®]GENE *Trichomonas vaginalis* is a multiplex real-time PCR for the direct, qualitative detection of *Trichomonas vaginalis* from human genital swabs and urine.

The RIDA[®]GENE *Trichomonas vaginalis* real-time PCR is intended for use as an aid in diagnosis of Trichomoniasis caused by *Trichomonas vaginalis*.

2. Summary and explanation of the test

Trichomonas vaginalis is a human pathogenic parasite that infects the genital area. It can lead to trichomoniasis where both sexual organs and also the urinary tract can be affected. Trichomoniasis is transmitted by sexual intercourse and is either transmitted through vaginal secretion or sperm indicating the infection potential for both men and women. Worldwide, 120 million cases are described yearly, whereas a higher prevalence rate is known in women.¹

According to the Centers of Disease Control and Prevention (CDC), about 3.7 million people are infected with *Trichomonas vaginalis* in the US. However, only 30% of the infected show symptoms.² Symptoms reach from discomfort in the vaginal area and with urination up to discharge. During a *Trichomonas vaginalis* infection in women, also a miscolonisation of the vaginal flora with other pathogens is observed. For example *Gardnerella vaginalis* or various stool pathogens often accompany a *Trichomonas vaginalis* infection. In pregnant women, an infection with *Trichomonas vaginalis* may lead to further complications such as premature labour or premature membrane rupture.³ Complications in men are amongst others infertility or prostatitis. Besides the miscolonisation of the vaginal flora, *Trichomonas vaginalis* also plays an important role as co-factor during transmission of HIV.² The gold standard for diagnosis is still culture, however sensitivity is only about 80% and with the time to result of up to 7 days it is not suitable for timely diagnosis.

3. Test principle

The RIDA[®]GENE *Trichomonas vaginalis* is a real-time PCR for the direct, qualitative detection of *Trichomonas vaginalis* from genital swabs, as well as from urine.

After DNA isolation, amplification of the gene fragment (ITS1, if present) specific for *Trichomonas vaginalis* occurs.

The amplified target for *Trichomonas vaginalis* is detected with hydrolysis probes, which are labeled at one end with a quencher and at the other end with a fluorescent reporter dye (fluorophore). In the presence of a target the probes hybridize to the amplicons. During the extension step the **Taq-Polymerase** breaks the reporter-quencher proximity. The reporter emits a fluorescent signal which is detected by the optical unit of a real-time PCR instrument. The fluorescence signal increases with the amount of formed amplicons. The RIDA[®]GENE *Trichomonas vaginalis* assay contains an **Internal Control DNA** (ICD) as an internal control of sample preparation procedure and/or to determine possible PCR inhibition.

4. Reagents provided

Tab. 1: Reagents provided (Reagents provided in the kit are sufficient for 100 determinations)

Kit Code	Reagent	Amount		Lid Color
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	yellow
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	red
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	white
P	Positive Control	1x	200 µl	blue

5. Storage instructions

- Protect all reagents from light and store at -20 °C. All reagents can be used until the expiration date. After expiry the quality guarantee is no longer valid.
- Carefully thaw and fully defrost reagents before using (e.g. in a refrigerator at 2 - 8 °C).
- Reagents can sustain up to 5 freeze/thaw cycles without influencing the assay performance (e.g. after the first thawing separate it in aliquots and freeze immediately).
- During PCR preparation all reagents should be stored cold in an appropriate way (2 - 8 °C).

6. Additional necessary reagents and necessary equipment

The RIDA[®] GENE Trichomonas vaginalis multiplex real-time PCR assay is suitable for use with following extraction platforms and real-time PCR instruments:

Tab. 2: Necessary equipment

Extraction platforms	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
bioMérieux	NucliSENS easy [®] MAG [™]
Real-time PCR instruments	
Roche	LightCycler [®] 2.0, LightCycler [®] 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 [™]
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Note: Only use 0.1 ml tubes on the Rotor-Gene Q (QIAGEN).

If you want to use other extraction platforms or real-time PCR instruments please contact R-Biopharm at mdx@r-biopharm.de.

- Sterile, media-free Rayon or Nylon flocced swabs (e.g. Copan Diagnostic Inc., catalogue no. 155C or 552C)

- RIDA[®] GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) for use with the LightCycler[®] 480II

- RIDA[®] GENE Color Compensation Kit II (PG0002) for use with the LightCycler[®] 2.0

- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foil)

- Centrifuge with a rotor for the reaction vials

- Vortexer

- Pipettes (0.5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)

- Filter tips

- Powder-free disposal gloves

- PCR water (BioScience grade, nuclease-free, DEPC treated water)

7. Precautions for users

For *in vitro* diagnostic use.

This test must only be carried out by trained laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories have to be followed. The instruction manual for the test procedure has to be followed. Do not pipet samples or reagents by mouth. Avoid contact with bruised skin or mucosal membranes. During handling reagents or samples, wear appropriate safety clothing (appropriate gloves, lab coat, safety goggles) and wash your hands after finishing the test procedure. Do not smoke, eat or drink in areas where samples or reagents are being used.

- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- Samples must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials being exposed to the samples and have to be handled according to the national safety regulations.
- Do not use the kit after the expiration date.

All reagents and materials used have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulations for disposal.

For more details see Safety Data Sheets (SDS) at www.r-biopharm.com.

8. Collection and storage

8.1 DNA-Preparation

For DNA isolation from dry swabs, use a commercially available DNA isolation kit (e.g. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) or DNA extraction system (e.g. Maxwell[®] RSC (Promega)). Extract DNA according to the manufacturer's instructions.

To isolate DNA from dry swabs the following procedure is recommended: Add 400 µl PCR water into a preparation tube. Insert the swab into the water, squeeze it and cut or break the swab stem. Cap the preparation tube tightly, vortex shortly and continue according to manufacturer's instruction of the DNA extraction kit or DNA extraction system (see also [Maxwell[®] RSC Application ER101](#)).

For DNA isolation from urine, use a commercially available DNA isolation kit (e.g. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) or DNA extraction system (e.g. Maxwell[®] RSC (Promega)). Extract DNA according to the manufacturer's instructions (see also [Maxwell[®] RSC Application ER100](#)).

The RIDA[®]GENE *Trichomonas vaginalis* assay contains an [Internal Control DNA](#) that detects PCR inhibition, monitors reagent integrity and confirms that nucleic acid extraction was sufficient. The [Internal Control DNA](#) can either be used as PCR inhibition control or as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control.

If the **Internal Control DNA** is used only as a PCR inhibition control, 1 µl of the **Internal Control DNA** should be added to the Master-Mix (see Tab.4).

If the **Internal Control DNA** is used as an extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, 20 µl of the **Internal Control DNA** has to be added during extraction procedure.

The **Internal Control DNA** should always be added to the specimen-lysis buffer mixture and must **not** be added directly to the specimen. We also recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the negative control and positive control PCR Mix.

9. Test procedure

9.1 Master-Mix preparation

Calculate the total number of PCR reactions (sample and control reactions) needed. One positive control and one negative control must be included in each assay run.

We recommend calculating an additional volume of 10 % to compensate imprecise pipetting (see Tab. 3, Tab. 4). Thaw, mix gently and briefly centrifuge the **Reaction Mix**, the **Taq-Polymerase**, the **Positive Control**, the **No Template Control** and the **Internal Control DNA** before using. Keep reagents appropriately cold during working step (2 - 8 °C).

Tab. 3: Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master-Mix (ICD as extraction and PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Taq-Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

Tab. 4: Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master-Mix (ICD only as PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Taq-Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
D	Internal Control DNA	1.0 µl	11 µl
	Total	21.0 µl	231.0 µl

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

9.2 Preparation of the PCR-Mix

Pipette 20 µl of the Master-Mix in each reaction vial (tube or plate).

Negative control: Add 5 µl **No Template Control** to the pre-pipetted Master-Mix.

Note: If the **Internal Control DNA** is used as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the PCR-Mix of the negative control.

Sample: Add 5 µl DNA extract to the pre-pipetted Master-Mix.

Positive control: Add 5 µl **Positive Control** to the pre-pipetted Master-Mix.

Note: If the **Internal Control DNA** is used as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the PCR-Mix of the positive control.

Cover tubes or plate. Spin down and place in the real-time PCR instrument. The PCR reaction should be started according to the PCR instrument set-up (see Tab. 5, Tab. 6, Tab.7, Tab.8).

9.3 PCR instrument set-up

9.3.1 DNA real-time PCR profile

Tab. 5: Real-time PCR profile for LightCycler® series and Rotor-Gene Q

Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

Tab. 6: Real-time PCR profile for Mx3005P, ABI 7500 and CFX96™

Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

9.3.2 Universal real-time PCR profile

Note: The universal real-time PCR profile should only be used for DNA assays when combining RIDA® GENE DNA and RIDA® GENE RNA real-time PCR assays in one run.

Tab. 7: Universal real-time PCR profile for LightCycler® series

<u>Reverse Transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

Tab. 8: Universal real-time PCR profile for Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q and CFX96™

<u>Reverse Transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

9.4 Detection channel set-up

Tab. 9: Selection of appropriate detection channels

Real-time PCR Gerät	Detection	Detection Channel	Note
Roche LightCycler® 2.0	<i>Trichomonas vaginalis</i>	530	RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) is required
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Trichomonas vaginalis</i>	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required
	ICD	533/580	
ABI 7500	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM	Check that passive reference option ROX is none
	ICD	VIC	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM	Check that passive reference dye is none
	ICD	HEX	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Green	The gain settings have to be set to 5
	ICD	Yellow	
Bio-Rad CFX96™	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM	-
	ICD	VIC	

10. Quality Control

The analysis of the samples is done by the software of the used real-time PCR instrument according to the manufacturer`s instructions. Negative control and positive control have to show correct results (see Tab. 10, Fig. 1) in order to determine a valid run.

The **Positive Control** has a concentration of 10^3 copies/ μ l. In each PCR run it is used in a total amount of 5×10^3 copies.

Tab. 10: For a valid run, the following conditions must be met:

Sample	Assay result	ICD Ct	Target Ct
Positive control	Positive	NA * ¹	See Quality Assurance Certificate
Negative control	Negative	Ct > 20	0

*¹ No Ct value is required for the ICD to make a positive call for the positive control.

If the positive control is not positive within the specified Ct range but the negative control is valid, prepare all new reactions including the controls.

If the negative control is not negative but the positive control is valid prepare all new reactions including the controls.

If the required criteria are not met, following items have to be checked before repeating the test:

- Expiry of the used reagents
- Functionality of the used instrumentation
- Correct performance of the test procedure

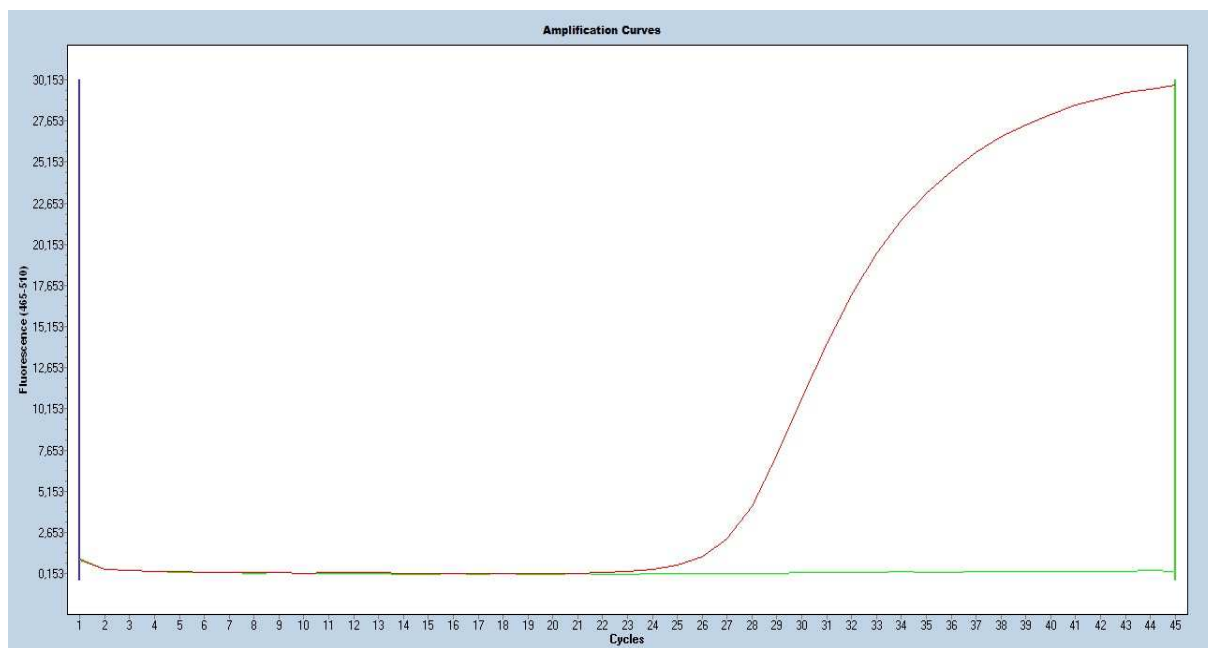


Fig.1: Correct run of the positive control and negative control (*Trichomonas vaginalis*) on the LightCycler® 480II

11. Result interpretation

The result interpretation is done according to Tab. 11.

Tab.11: Sample interpretation

Target genes		
<i>T. vaginalis</i>	ICD	Result
positive	positive/negative	<i>Trichomonas vaginalis</i> detected
negative	positive	Target gene not detected
negative	negative	Invalid

Trichomonas vaginalis is detected, if the sample DNA and the **Internal Control DNA** show an amplification signal in the detection system.

Trichomonas vaginalis is also detected, if the sample DNA shows an amplification signal but none for the **Internal Control DNA** in the detection system. The detection of the internal amplification control is not necessary because high concentrations of the amplicon can cause a weak or absent signal of the **Internal Control DNA**.

Trichomonas vaginalis is not detected, if the sample DNA shows no amplification signal, but an amplification signal for the **Internal Control DNA** in the detection system. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the detection of the **Internal Control DNA**.

A sample is invalid, if the sample DNA and Internal Control DNA show no amplification signal in the detection system. The sample contains a PCR inhibitor or a failure occurred in the extraction procedure. The extracted sample needs to be further diluted with PCR water (1:10) and amplified again, or the isolation and purification of the sample has to be improved.

12. Limitations of the method

1. The result of molecular analysis should not lead to the diagnosis, but always be considered in the context of medical history and symptoms of the patient.
2. This assay is only validated for human genital swabs and urine samples.
3. Inappropriate specimen collection, transport, storage and processing or a pathogen load in the specimen below the analytical sensitivity can result in false negative results.
4. The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
5. Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new variants resulting in a false negative result with the RIDA[®] GENE *Trichomonas vaginalis* assay.
6. As with all PCR based *in vitro* diagnostic tests, extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
7. A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. However, a positive result is indicative for the presence of the target gene (ITS1).

13. Performance characteristics

13.1 Analytical sensitivity

The RIDA[®] GENE *Trichomonas vaginalis* multiplex real-time PCR has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction. The following figure 2 shows a dilution series of *Trichomonas vaginalis* ($10^5 - 10^1$ DNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II.

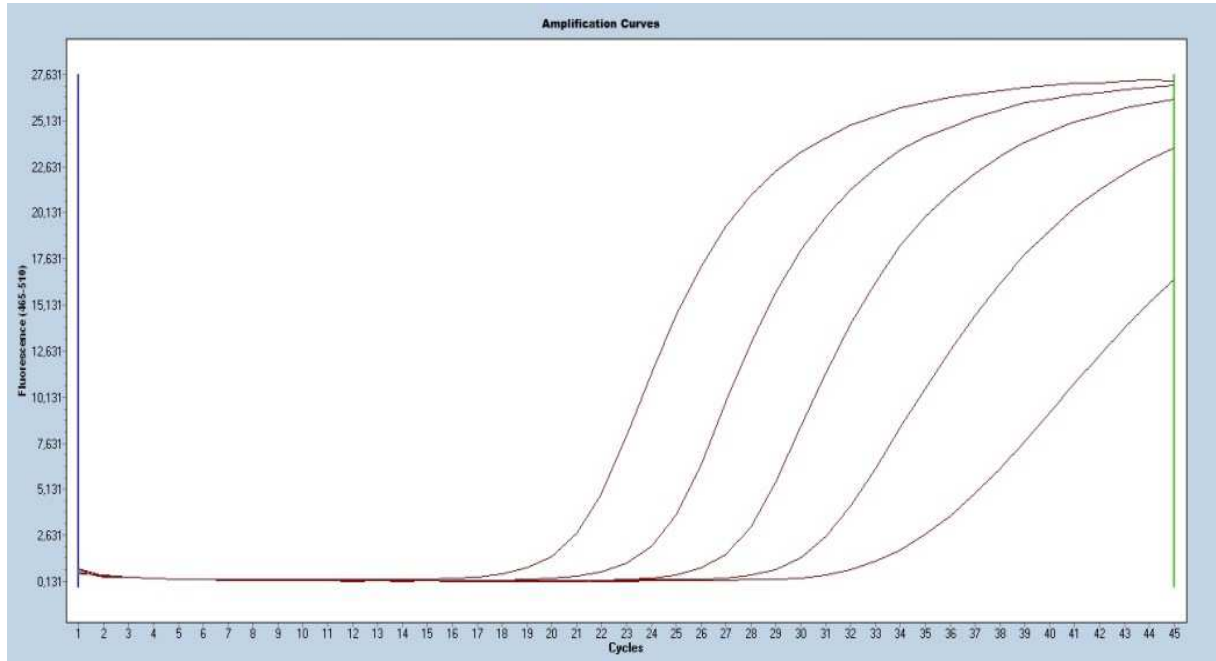


Fig. 2: Dilution series *Trichomonas vaginalis* ($10^5 - 10^1$ DNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II

The detection limit of the whole procedure depends on the sample matrix, DNA extraction and DNA concentration.

13.2 Analytical specificity

The analytical specificity of the RIDA[®] GENE *Trichomonas vaginalis* multiplex real-time PCR is specific for *Trichomonas vaginalis*. No cross-reaction could be detected for the following species (see Tab. 12):

Tab. 12: Cross-reactivity testing










Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-
Adenovirus 7, human, strain Gomen	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone 6	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 40, human, strain Dugan	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 41, human, strain Tak	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	HSV 1	-	Rotavirus	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	HSV 2	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	HPV 6b	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	HPV 16	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Atopobium vaginae</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	HPV 18	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Mobiluncus curtisii</i> subsp. <i>curtisii</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Mycoplasma fermentans</i>	-	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Norovirus GGI	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	Norovirus GGII	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i>	-						

14. Version history

Version number	Chapter and designation
2014-11-09	Release version
2018-04-18	General revision
2018-04-18	4. Reagents provided 6. Additional necessary reagents and necessary equipment 8. Collection and storage 9. Test procedure 13. Performance characteristics 14. Version history 15. Explanation of symbols

15. Explanation of symbols

General symbols

	For <i>in vitro</i> diagnostic use
	Consult instructions for use
	Lot number
	Expiry
	Store at
	Article number
	Number of tests
	Date of manufacture
	Manufacturer

Testspecific symbols

Not applicable

16. Literature

1. Sutton M. et al. The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among Reproductive-age women in the United States, 2001-2004. *Clin Infect Disease*, 2007; 45:1319-1326.
2. <https://www.cdc.gov/std/trichomonas/stdfact-trichomoniasis.htm> accessed 18.04.2018
3. Soper D. Trichomoniasis. Under Control or Undercontrolled? *Am J Obstet Gynecol*. 2004; 190:281-290.

RIDA® GENE Trichomonas vaginalis

REF PG4975

1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA® GENE Trichomonas vaginalis es un ensayo multiplex de PCR en tiempo real para la detección directa y cualitativa de *Trichomonas vaginalis* a partir de frotis genitales y de orina humanos.

El ensayo de PCR en tiempo real RIDA® GENE Trichomonas vaginalis está concebido como una ayuda para el diagnóstico de tricomoniasis causada por *Trichomonas vaginalis*.

2. Resumen y descripción del ensayo

Trichomonas vaginalis es un parásito patógeno para los humanos que infecta el área genital. Puede dar lugar a tricomoniasis, que puede afectar tanto a los órganos sexuales como a las vías urinarias. La tricomoniasis se transmite mediante las relaciones sexuales a través de las secreciones vaginales o esperma, lo que indica un potencial de infección tanto para hombres como mujeres. Cada año se describen 120 millones de casos en todo el mundo, aunque la tasa de prevalencia más alta ocurre en las mujeres.¹

De acuerdo con los Centros para el control y la prevención de enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), aproximadamente 3.7 millones de personas en Estados Unidos están infectadas con *Trichomonas vaginalis*. No obstante, solo el 30 % de los infectados presentan síntomas.² Los síntomas van desde malestar en el área vaginal y con la micción, hasta la secreción. Durante una infección con *Trichomonas vaginalis* en las mujeres, también se observa una colonización nociva de la flora vaginal con otros patógenos. Por ejemplo, una infección por *Trichomonas vaginalis* suele estar acompañada por *Gardnerella vaginalis* u otros patógenos fecales diversos. En mujeres embarazadas, una infección con *Trichomonas vaginalis* puede dar lugar a otras complicaciones, tales como un parto prematuro o la ruptura prematura de membranas.³ En los varones, las complicaciones pueden ser infertilidad o prostatitis, entre otras.

Además de la colonización nociva de la flora vaginal, *Trichomonas vaginalis* también tiene una función importante como cofactor durante la transmisión del VIH.² El método de referencia para el diagnóstico sigue siendo el cultivo, sin embargo, la sensibilidad es de solo alrededor del 80 % y el tiempo para obtener el resultado es de hasta 7 días, por lo que no es adecuado para un diagnóstico oportuno.

3. Principio del ensayo

RIDA® GENE *Trichomonas vaginalis* es un ensayo de PCR en tiempo real para la detección directa y cualitativa de *Trichomonas vaginalis* a partir de frotis genitales y de orina.

Después del aislamiento del ADN, ocurre la amplificación del fragmento genético (ITS1, si está presente) específico de *Trichomonas vaginalis*.

La diana amplificada de *Trichomonas vaginalis* se detecta mediante sondas de hidrólisis, marcadas en un extremo con un extintor de fluorescencia y en el otro con un colorante fluorescente indicador (fluoróforo). En presencia de una diana, las sondas se hibridan a los amplicones. Durante el paso de extensión, la **Taq-Polymerase** rompe la proximidad del indicador-extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta en función de la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA® GENE *Trichomonas vaginalis* contiene un **Internal Control DNA** (ICD) como control interno del procedimiento de preparación de la muestra o para determinar la posible inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones)

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarilla
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	roja
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	naranja
N	No Template Control	1x	450 µl	blanca
P	Positive Control	1x	200 µl	azul

5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben conservarse protegidos de la luz y a una temperatura de -20 °C. Todos los reactivos pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad. Después de la fecha de vencimiento, la garantía de calidad ya no es válida.
- Descongele con cuidado y por completo los reactivos antes de utilizarlos (p. ej., en un refrigerador a 2 - 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 5 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte a la eficacia diagnóstica del ensayo (p. ej., tras la primera descongelación, es conveniente separar en alícuotas y congelar de inmediato).

- Durante la preparación de la PCR, todos los reactivos deben conservarse en frío de forma adecuada (2 - 8 °C).

6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario

El ensayo multiplex de PCR en tiempo real RIDA® GENE Trichomonas vaginalis es adecuado para utilizarse con las siguientes plataformas de extracción y equipos de PCR en tiempo real:

Tabla 2: Equipamiento necesario

Plataformas de extracción	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
bioMérieux	NucliSENS easy®MAG™
Equipos de PCR en tiempo real	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: Utilice únicamente tubos de 0.1 ml en el Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Si desea utilizar otras plataformas de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm en mdx@r-biopharm.de.

- Hisopos flocados estériles, sin medio de cultivo, de rayón o nylon (p. ej., Copan Diagnostic Inc., ref. 155C o 552C)

- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler® 480II

- RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) para uso con el LightCycler® 2.0

- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)

- Centrífuga y rotor para los viales de reacción

- Agitador vórtex

- Pipetas (0.5 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl)

- Puntas con filtro

- Guantes desechables sin talco

- Agua para PCR (Grado BioScience, sin nucleasas, agua tratada con DEPC)

7. Precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respetar las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Seguir las indicaciones del manual de instrucciones para la ejecución de la prueba. No pipetear muestras ni reactivos con la boca. Evitar el contacto con piel herida o mucosas. Durante la manipulación de reactivos o muestras, llevar ropa de seguridad adecuada (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lavarse las manos al finalizar la ejecución de la prueba. No fumar, comer ni beber en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos de los ensayos.

- La extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha deben llevarse a cabo en diferentes salas para evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas, al igual que todos los reactivos y materiales expuestos a las muestras, y deben manipularse según las normativas nacionales de seguridad.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.

Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso. Consultar las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

Para obtener más información, consultar la hoja de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com.

8. Recolección y almacenamiento

8.1 Preparación del ADN

Para el aislamiento del ADN a partir de hisopos secos, use un kit de aislamiento de ADN (p. ej. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) o un sistema de extracción de ADN (p. ej. Maxwell[®] RSC (Promega)) disponibles en el mercado. Extraiga el ADN siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para aislar el ADN a partir de hisopos secos se recomienda el procedimiento siguiente: Añada 400 µl de agua para PCR a un tubo de preparación. Inserte el hisopo en el agua, apriételo, y corte o rompa la varilla. Tape y apriete bien el tubo de preparación, mezcle en un agitador vórtex brevemente y siga las instrucciones del fabricante del kit de extracción de ADN o del sistema de extracción de ADN (consulte también [la aplicación ER101 del equipo Maxwell[®] RSC](#)).

Para el aislamiento del ADN a partir de orina, use un kit de aislamiento de ADN (p. ej. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) o un sistema de extracción de ADN (p. ej. Maxwell[®] RSC (Promega)) disponibles en el mercado. Extraiga el ADN siguiendo las instrucciones del fabricante (consulte también [la aplicación ER100 del equipo Maxwell[®] RSC](#)).

El ensayo RIDA[®] GENE *Trichomonas vaginalis* contiene un Internal Control DNA que detecta la inhibición de la PCR, monitoriza la integridad de

los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El **Internal Control DNA** puede usarse como control de inhibición de la PCR, o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el **Internal Control DNA** se utiliza únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe añadir 1 µl del **Internal Control DNA** a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se deben añadir 20 µl del **Internal Control DNA** durante el procedimiento de extracción.

El **Internal Control DNA** debe añadirse siempre a la mezcla de búfer de lisado de muestras y **no** directamente a la muestra. También se recomienda añadir 1 µl del **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

9. Ejecución de la prueba

9.1 Preparación de la mezcla maestra

Calcule el número total de reacciones de PCR necesarias (reacciones de muestra y de control). En cada ensayo debe incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda calcular un 10 % de volumen adicional para compensar las imprecisiones en el pipeteo (consulte las tablas 3 y 4). Descongele, mezcle suavemente y centrifugue brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, el **Positive Control**, el **No Template Control** y el **Internal Control DNA** antes de utilizarlos. Conserve los reactivos correctamente en frío (2 - 8 °C) durante el paso de trabajo.

Tabla 3: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de extracción y de inhibición de la PCR)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

Tabla 4: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de inhibición de la PCR únicamente)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúgelos brevemente.

9.2 Preparación de la mezcla para PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (tubo o placa).

Control negativo: Añada 5 µl de **No Template Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda añadir 1 µl del **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo.

Muestra: Añada 5 µl de extracto de ADN a la mezcla maestra prepipeteada.

Control positivo: Añada 5 µl de **Positive Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda añadir 1 µl del **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control positivo.

Tape los tubos o la placa. Centrifúgelos y colóquelos en el equipo de PCR en tiempo real. La reacción de PCR debe iniciarse según la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 5, 6, 7 y 8).

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil de ADN por PCR en tiempo real

Tabla 5: Perfil de PCR en tiempo real para los equipos LightCycler® y Rotor-Gene Q

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Transición/rampa de temperatura	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Tabla 6: Perfil de PCR en tiempo real para Mx3005P, ABI 7500 y CFX96™

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Transición/rampa de temperatura	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

9.3.2 Perfil universal por PCR en tiempo real

Nota: El perfil universal por PCR en tiempo real se debe usar en los ensayos de ADN solo cuando se combinan en una corrida los ensayos de ADN RIDA® GENE y ARN RIDA® GENE por PCR en tiempo real.

Tabla 7: Perfil universal por PCR en tiempo real en el equipo LightCycler®

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Transición/rampa de temperatura	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

Tabla 8: Perfil universal por PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q y CFX96™

Transcripción inversa	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
PCR Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Transición/rampa de temperatura	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 9: Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
Roche LightCycler® 2.0	<i>Trichomonas vaginalis</i>	530	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Trichomonas vaginalis</i>	465/510	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
ABI 7500	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna)
	ICD	VIC	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM	Compruebe que el colorante de referencia pasivo sea «none» (ninguno)
	ICD	HEX	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Verde	La ganancia debe configurarse en 5
	ICD	Amarillo	
Bio-Rad CFX96™	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM	-
	ICD	VIC	

10. Control de Calidad

El software del equipo de PCR en tiempo real utilizado analiza las muestras según las instrucciones del fabricante. El control negativo y el control positivo deben presentar los resultados correctos (consulte la tabla 10, figura 1) para que la corrida se considere válida.

El **Positive Control** tiene una concentración de 10^3 copias/ μ l. En cada ensayo de PCR, se utiliza una cantidad total de 5×10^3 copias.

Tabla 10: Para que un ensayo sea válido, deben cumplirse las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado del ensayo	Ct del ICD	Ct de la diana
Control positivo	Positivo	NA *1	Consulte el certificado de garantía de calidad
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

*1 No se requiere un valor de Ct del ICD para determinar que el control positivo es positivo.

Si el control positivo no es positivo en el intervalo de Ct especificado, pero el control negativo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si no se cumplen los criterios requeridos, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de vencimiento de los reactivos utilizados
- Funcionalidad de los equipos utilizados
- Ejecución correcta de la prueba

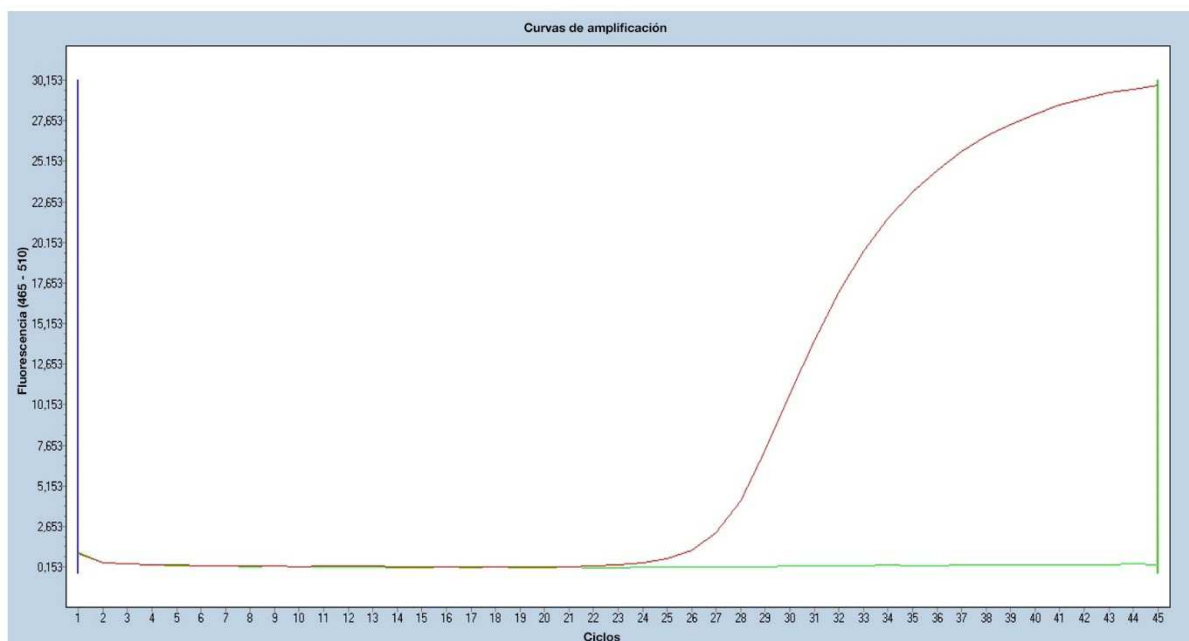


Fig.1: Procesamiento correcto del control positivo y del control negativo (*Trichomonas vaginalis*) en el LightCycler® 480II

11. Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 11.

Tabla 11: Interpretación de las muestras

Genes diana		
<i>T. vaginalis</i>	ICD	Resultado
positivo	positivo/negativo	<i>Trichomonas vaginalis</i> detectado
negativo	positivo	Gen diana no detectado
negativo	negativo	No válido

Trichomonas vaginalis se detecta si el ADN de la muestra y el **Internal Control DNA** muestran una señal de amplificación en el sistema de detección.

Trichomonas vaginalis también se detecta si hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero no del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La detección del control de amplificación interno no es necesaria debido a que las altas concentraciones del amplicón pueden hacer que la señal del **Internal Control DNA** sea débil o esté ausente.

Trichomonas vaginalis no se detecta si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero hay señal de amplificación del **Internal Control DNA** en el sistema

de detección. La inhibición de la reacción de PCR se puede excluir por la detección del ADN del **Internal Control DNA**.

La muestra no es válida si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra y del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La muestra contiene un inhibidor de la PCR o se produjo un fallo en el procedimiento de extracción. Es necesario diluir aún más la muestra extraída con agua para PCR (1:10) y amplificarla de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

12. Limitaciones del método

1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo está validado solo para frotis genitales y muestras de orina humanas.
3. La recogida, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de la muestra, o una carga de patógenos en la muestra inferior a la sensibilidad analítica pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
4. La presencia de inhibidores de la PCR puede ocasionar resultados no válidos.
5. Las mutaciones o polimorfismo en las regiones de unión del cebador o la sonda pueden afectar a la detección de nuevas variantes, y producir un resultado negativo falso con el ensayo RIDA[®] GENE Trichomonas vaginalis.
6. Como ocurre con todas las pruebas diagnósticas de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de la diana, por debajo del límite de detección (LoD), pero los resultados podrían no ser reproducibles.
7. Un resultado positivo de la prueba no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. No obstante, un resultado positivo indica la presencia del gen diana (ITS1).

13. Características de rendimiento

13.1 Sensibilidad analítica

El ensayo multiplex de PCR en tiempo real RIDA® GENE *Trichomonas vaginalis* tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de ADN por reacción. En la figura 2 se muestra una dilución seriada de *Trichomonas vaginalis* ($10^5 - 10^1$ copias de ADN por μl) en el LightCycler® 480II.

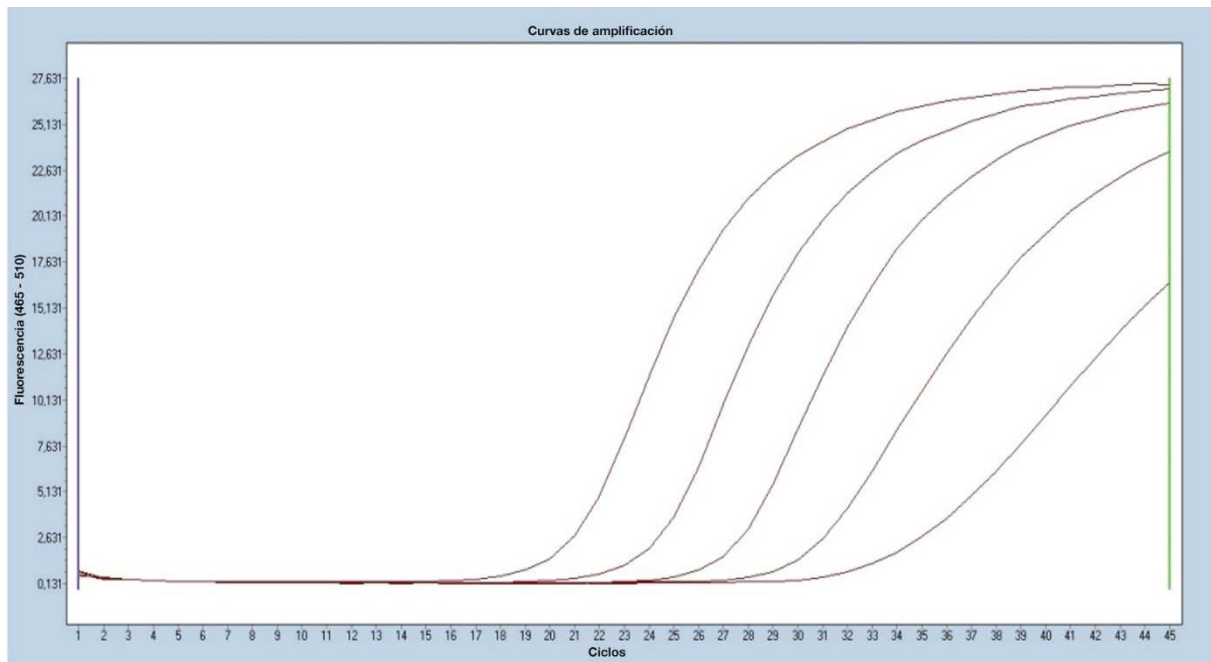


Fig. 2: Dilución seriada de *Trichomonas vaginalis* ($10^5 - 10^1$ copias de ADN por μl) en el LightCycler® 480II

El límite de detección de todo el procedimiento depende de la matriz de la muestra, la extracción del ADN y la concentración del ADN.

13.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del ensayo multiplex de PCR en tiempo real RIDA® GENE Trichomonas vaginalis es específica para *Trichomonas vaginalis*. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 12):

Tabla 12: Pruebas de reactividad cruzada










Adenovirus 1, humano, cepa Adenoid 71	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-
Adenovirus 7, humano, cepa Gomen	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB clon 6	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 40, humano, cepa Dugan	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 41, humano, cepa Tak	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	VHS 1	-	Rotavirus	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	VHS 2	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	VPH 6b	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	VHP 16	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Atopobium vaginae</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	VHP 18	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Mobiluncus curtisii</i> subsp. <i>curtisii</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Mycoplasma fermentans</i>	-	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Norovirus GGI	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	Norovirus GGII	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i>	-						

14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
09/11/2014	Versión de lanzamiento
18/04/2018	Revisión general
18/04/2018	4. Reactivos suministrados 6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario 8. Recolección y almacenamiento 9. Ejecución de la prueba 13. Características de rendimiento 14. Historial de versiones 15. Explicación de los símbolos

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Consulte las instrucciones de uso
	Número de lote
	Fecha de vencimiento
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de pruebas
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

No aplicable

16. Referencias bibliográficas

1. Sutton M. et al. The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among Reproductive-age women in the United States, 2001-2004. *Clin Infect Disease*, 2007; 45:1319-1326.
2. <https://www.cdc.gov/std/trichomonas/stdfact-trichomoniasis.htm> accessed 18.04.2018
3. Soper D. Trichomoniasis. Under Control or Undercontrolled? *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 190:281-290.

RIDA[®] GENE *Trichomonas vaginalis*

REF PG4975

1. Application

Pour usage diagnostique *in vitro*. Le test RIDA[®] GENE *Trichomonas vaginalis* est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe de *Trichomonas vaginalis* dans l'urine et les frottis génitaux humains.

Le test de PCR en temps réel RIDA[®] GENE *Trichomonas vaginalis* est destiné à faciliter le diagnostic de la trichomonase provoquée par *Trichomonas vaginalis*.

2. Résumé et explication du test

Trichomonas vaginalis est un parasite pathogène de l'être humain qui infecte la région génitale. Il peut provoquer la trichomonase qui touche les organes sexuels et les voies urinaires. La trichomonase est transmise lors de rapports sexuels, soit par les sécrétions vaginales soit par le sperme, ce qui veut dire que tant les hommes que les femmes peuvent être infectés. 120 millions de cas sont décrits chaque année dans le monde, le taux de prévalence étant plus élevé chez les femmes¹.

Selon les Centres de contrôle et de prévention des maladies (CDC), environ 3,7 millions de personnes sont infectées par *Trichomonas vaginalis* aux États-Unis. Cependant, seulement 30 % des personnes infectées présentent des symptômes² qui vont depuis la gêne dans la région vaginale et lors de la miction jusqu'à l'écoulement. Lors d'une infection par *Trichomonas vaginalis*, on observe aussi chez les femmes une colonisation de la flore vaginale par d'autres pathogènes. Par exemple, une infection par *Trichomonas vaginalis* est souvent accompagnée de *Gardnerella vaginalis* ou de plusieurs pathogènes des selles. Chez les femmes enceintes, une infection par *Trichomonas vaginalis* peut provoquer des complications comme un travail prématuré ou une rupture de membrane prématurée³. Chez l'homme, les complications sont, entre autres, l'infertilité ou la prostatite.

Outre la colonisation de la flore vaginale, *Trichomonas vaginalis* joue aussi un rôle de co-facteur lors de la transmission du VIH². Le standard pour le diagnostic reste encore la culture, mais la sensibilité n'est que de 80 % avec un délai d'obtention de résultats pouvant atteindre 7 jours, ce qui ne permet pas de poser un diagnostic rapide.

3. Principe du test

Le test RIDA[®]GENE *Trichomonas vaginalis* est un test de PCR en temps réel pour la détection qualitative directe de *Trichomonas vaginalis* dans l'urine et les frottis génitaux.

Après isolation de l'ADN survient l'amplification du fragment de gène (ITS1, si présent) spécifique au *Trichomonas vaginalis*.

La cible amplifiée pour *Trichomonas vaginalis* est détectée grâce à des sondes pour hydrolyse qui sont marquées à une extrémité par un extincteur et à l'autre extrémité par un colorant fluorescent indicateur (fluorophore). En présence d'une cible, les sondes s'hybrident aux amplicons. Pendant l'étape d'extension, la **Taq-Polymerase** rompt la proximité indicateur-extincteur. L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un instrument de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec le nombre d'amplicons formés. Le test RIDA[®]GENE *Trichomonas vaginalis* contient un **Internal Control DNA** (ICD) en tant que contrôle interne de la procédure de préparation des échantillons et/ou pour déterminer une éventuelle inhibition de la PCR.

4. Contenu du paquet

Tableau 1 : Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 100 déterminations)

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du couvercle
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	jaune
2	Taq-Polymérase	1x	80 µl	rouge
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	blanc
P	Positive Control	1x	200 µl	bleu

5. Instructions de conservation des réactifs

- Protéger tous les réactifs de la lumière et les conserver à -20 °C. Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Décongeler délicatement tous les réactifs avant de les utiliser (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 et 8 °C).
- Les réactifs peuvent supporter jusqu'à 5 cycles de congélation/décongélation sans que la performance du test ne soit affectée (par ex., après la première décongélation, séparer les réactifs en aliquotes et les congeler immédiatement).

- Pendant la préparation de la PCR, tous les réactifs doivent être conservés au frais de manière convenable (entre 2 et 8 °C).

6. Autres réactifs et matériel nécessaires

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA[®]GENE Trichomonas vaginalis peut être utilisé avec les plateformes d'extraction et les instruments de PCR en temps réel suivants :

Tableau 2 : Matériel nécessaire

Plateformes d'extraction	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
bioMérieux	NucliSENS easy [®] MAG [™]
Instruments de PCR en temps réel	
Roche	LightCycler [®] 2.0, LightCycler [®] 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 [™]
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Remarque : utiliser uniquement des tubes de 0,1 ml sur le Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Si vous souhaitez utiliser d'autres plateformes d'extraction ou instruments de PCR en temps réel, contactez R-Biopharm à l'adresse mdx@r-biopharm.de.

- Écouvillons floqués secs en rayonne ou nylon stériles (par ex., Copan Diagnostic Inc., référence 155C ou 552C)

- Kit de compensation de couleur RIDA[®]GENE IV (PG0004) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler[®] 480II

- Kit de compensation de couleur RIDA[®]GENE II (PG0002) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler[®] 2.0

- Consommables de PCR en temps réel (plaques, tubes, feuilles)

- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons de réaction

- Agitateur-mélangeur vortex

- Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl)

- Pointes à filtre

- Gants jetables sans poudre

- Eau de PCR (qualité BioScience, sans nucléase, eau traitée au DEPC)

7. Mesures de précaution

Pour usage diagnostique *in vitro*.

Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Suivre le manuel d'instructions pour la réalisation du test. Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec une peau meurtrie ou les membranes muqueuses. Lors de la manipulation de réactifs ou d'échantillons, porter des vêtements de protection appropriés (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue de la réalisation du test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs sont utilisés.

- L'extraction, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR doivent être menées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée.
- Les échantillons doivent être traités comme du matériel potentiellement infectieux de même que tous les réactifs et le matériel exposés aux échantillons. Ils doivent être manipulés conformément aux règlements nationaux en matière de sécurité.
- Ne pas utiliser le kit après sa date de péremption.

Après utilisation, tous les réactifs et matériaux utilisés doivent être éliminés de façon appropriée. Veuillez vous conformer aux règlements nationaux applicables concernant la mise au rebut.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur www.r-biopharm.com.

8. Prélèvement et conservation

8.1 Préparation de l'ADN

Pour isoler l'ADN des écouvillons secs, utiliser un kit d'isolation d'ADN (par ex., RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) ou un système d'extraction d'ADN (par ex., Maxwell[®] RSC (Promega)) disponible dans le commerce. Extraire l'ADN conformément aux instructions du fabricant.

Pour isoler l'ADN des écouvillons secs, il est recommandé de suivre la procédure suivante : Ajouter 400 µl d'eau de PCR dans un tube de préparation. Insérer l'écouvillon dans l'eau, le presser et couper ou casser la tige de l'écouvillon. Fermer hermétiquement le tube de préparation et continuer conformément aux instructions du fabricant du kit ou du système d'extraction de l'ADN (voir aussi **Maxwell[®] RSC Application ER101**).

Pour isoler l'ADN de l'urine, utiliser un kit d'isolation d'ADN (par ex., RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) ou un système d'extraction d'ADN (par ex., Maxwell[®] RSC (Promega)) disponible dans le commerce. Extraire l'ADN conformément aux instructions du fabricant (voir aussi **Maxwell[®] RSC Application ER100**).

Le test RIDA[®]GENE *Trichomonas vaginalis* inclut un **Internal Control DNA** qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction

d'acides nucléiques a été suffisante. Le **Internal Control DNA** peut être utilisé comme contrôle de l'inhibition de la PCR ou comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et en tant que contrôle de l'inhibition de la PCR.

Si le **Internal Control DNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 1 µl de **Internal Control DNA** au mélange maître (voir tableau 4).

Si le **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 20 µl de **Internal Control DNA** pendant la procédure d'extraction. Le **Internal Control DNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est aussi recommandé d'ajouter 1 µl de **Internal Control DNA** au mélange de contrôle négatif et contrôle positif de la PCR.

9. Réalisation du test

9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions de PCR (réactions de l'échantillon et réactions de contrôle) nécessaires. Il faut inclure un contrôle positif et un contrôle négatif dans chaque exécution du test.

Nous recommandons de calculer un volume supplémentaire de 10 % pour compenser l'imprécision du pipetage (voir tableaux 3 et 4). Décongeler, mélanger délicatement et centrifuger brièvement le **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, le **Positive Control**, le **Positive Control**, le **No Template Control** et l'**Internal Control DNA** avant utilisation. Conserver les réactifs à une température assez basse durant l'étape de travail (entre 2 et 8 °C).

Tableau 3 : Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICD comme contrôle de l'extraction et de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

Tableau 4 : Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICD uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % supplémentaires)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µl du mélange maître dans chaque flacon de réaction (tube ou plaque).

Contrôle négatif : Ajouter 5 µl de **No Template Control** au mélange maître pré-pipeté.

Remarque : si l' **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 1 µl d' **Internal Control DNA** au mélange de contrôle négatif pour la PCR.

Échantillon : Ajouter 5 µl d'extrait d'ADN au mélange maître pré-pipeté.

Contrôle positif : Ajouter 5 µl de **Positive Control** au mélange maître pré-pipeté.

Remarque : si l' **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 1 µl d' **Internal Control DNA** au mélange de contrôle positif pour la PCR.

Recouvrir les tubes ou la plaque. Les centrifuger et les placer dans l'instrument de PCR en temps réel. La réaction de PCR devrait commencer conformément à la configuration de l'instrument de PCR (voir tableaux 5 et 6, tableau 7, tableau 8).

9.3 Configuration de l'instrument de PCR

9.3.1 Profil de PCR en temps réel de l'ADN

Tableau 5 : Profil de PCR en temps réel pour la série LightCycler® et Rotor-Gene Q

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Tableau 6 : Profil de PCR en temps réel pour Mx3005P, ABI 7500 et CFX96™

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

9.3.2 Profil universel de PCR en temps réel

Remarque : le profil universel de PCR en temps réel doit seulement être utilisé pour les tests d'ADN si les tests PCR en temps réel ADN RIDA[®] GENE et ARN RIDA[®] GENE sont effectués lors d'une même exécution.

Tableau 7 : Profil universel de PCR en temps réel pour la série LightCycler[®]

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Tableau 8 : Profil universel de PCR en temps réel pour Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q et CFX96™

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

9.4 Configuration du canal de détection

Tableau 9 : Sélection des canaux de détection adéquats

Instruments de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Remarque
Roche LightCycler® 2.0	<i>Trichomonas vaginalis</i>	530	RIDA® GENE Le kit de compensation de couleur II (PG0002) est
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Trichomonas vaginalis</i>	465/510	RIDA® GENE Le kit de compensation de couleur IV (PG0004)
	ICD	533/580	
ABI 7500	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM	Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée
	ICD	VIC	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM	Vérifier que le colorant de référence passif n'est pas précisé
	ICD	HEX	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Vert	Les paramètres de gain doivent être réglés sur 5
	ICD	Jaune	
Bio-Rad CFX96™	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM	-
	ICD	VIC	

10. Contrôle qualité

L'analyse des échantillons est effectuée par le logiciel de l'instrument de PCR en temps réel utilisé conformément aux instructions du fabricant. Le contrôle négatif et le contrôle positif doivent obtenir des résultats corrects (voir tableau 10, figure 1) pour que l'exécution soit déclarée valide.

Le **Positive Control** a une concentration de 10^3 copies/ μ l. Chaque série de PCR utilise au total 5×10^3 copies de contrôle positif.

Tableau 10 : Pour que l'exécution soit valide, les conditions suivantes doivent être satisfaites :

Échantillon	Résultat du test	Ct ICD	Ct cible
Contrôle positif	Positif	S/O *1	Voir Certificat d'assurance qualité
Contrôle négatif	Négatif	Ct > 20	0

*1 Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICD soit positif pour le contrôle positif.

Si le contrôle positif n'est pas positif dans la plage de Ct spécifiée, mais le contrôle négatif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais le contrôle positif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si les critères requis ne sont pas satisfaits, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnement de l'instrumentation utilisée
- Exécution correcte de la procédure de test

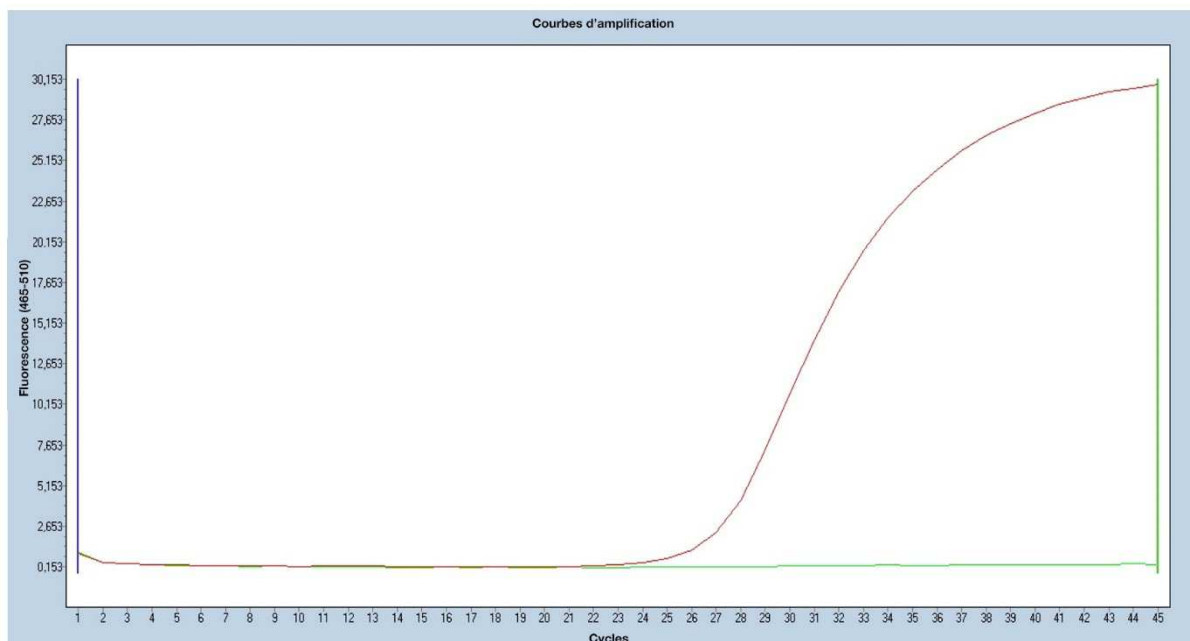


Fig.1 : Exécution correcte des contrôles positif et négatif (*Trichomonas vaginalis*) sur le LightCycler® 480II

11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 11.

Tableau 11 : Interprétation des échantillons

Gènes cibles		
<i>T. vaginalis</i>	ICD	Résultat
positif	positif/négatif	<i>Trichomonas vaginalis</i> détecté
négatif	positif	Gène cible non détecté
négatif	négatif	Non valide

Trichomonas vaginalis est détecté si l'ADN de l'échantillon et l'**Internal Control DNA** présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

Trichomonas vaginalis est également détecté si l'ADN de l'échantillon présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais aucun pour l'**Internal Control DNA**. La détection du contrôle d'amplification interne n'est pas nécessaire, car les concentrations élevées de l'amplicon peuvent générer un signal faible ou absent du **Internal Control DNA**.

Trichomonas vaginalis n'est pas détecté si l'ADN de l'échantillon ne présente aucun signal d'amplification dans le système de détection, mais en présente un pour

l'Internal Control DNA]. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection du Internal Control DNA].

Un échantillon est non valide si l'ADN de l'échantillon et l'Internal Control DNA] ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. L'échantillon contient un inhibiteur de la PCR ou la procédure d'extraction est défectueuse. L'échantillon extrait doit être encore dilué avec de l'eau de PCR (1/10) et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

12. Limites de la méthode

1. Le résultat de l'analyse moléculaire ne doit pas mener au diagnostic, mais toujours être envisagé dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est seulement validé pour les frottis génitaux et les échantillons d'urine humains.
3. Un prélèvement, transport, stockage et traitement incorrects du spécimen ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
4. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats non valides.
5. Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison à l'amorce ou à la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants et donner lieu à un résultat faux négatif avec le test RIDA® GENE Trichomonas vaginalis.
6. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* de type PCR, des niveaux de la cible extrêmement bas sous la limite de détection (LDD) peuvent être détectés, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
7. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Cependant, un résultat positif indique la présence du gène cible (ITS1).

13. Performances

13.1 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE *Trichomonas vaginalis* est ≥ 10 copies d'ADN par réaction. La figure 2 ci-dessous présente une série de dilutions de *Trichomonas vaginalis* ($10^5 - 10^1$ copies d'ADN par μl) avec le LightCycler® 480II.

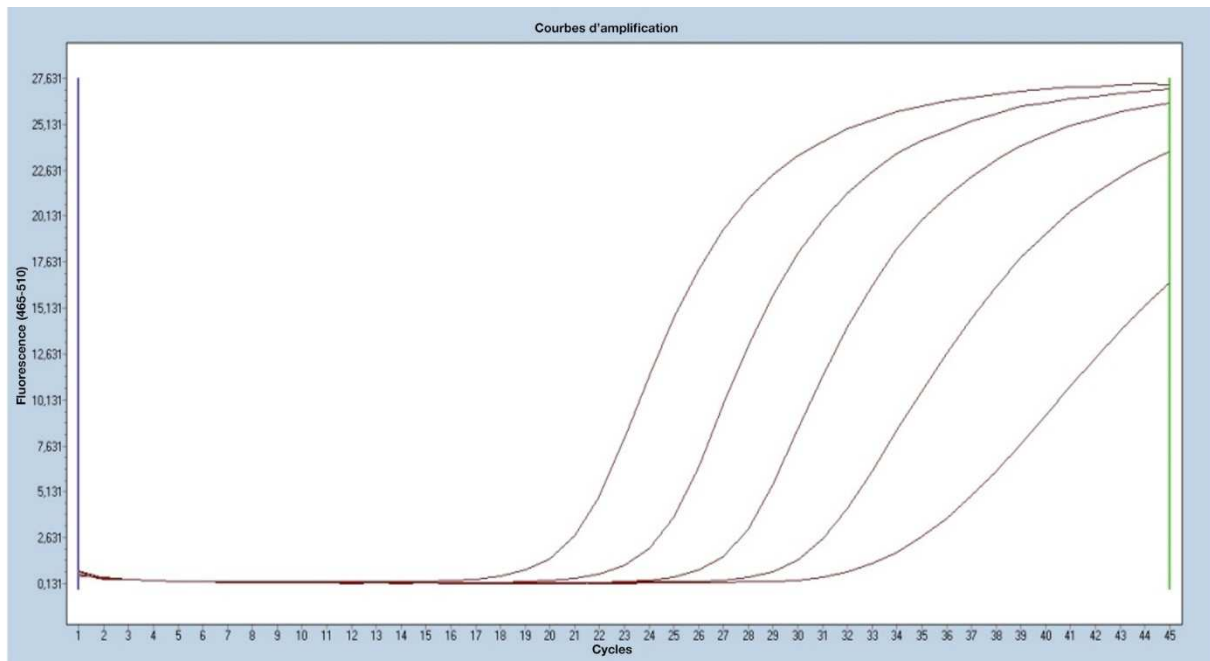


Figure 2 : Série de dilutions de *Trichomonas vaginalis* ($10^5 - 10^1$ copies d'ADN par μl) avec le LightCycler® 480II

La limite de détection de l'ensemble de la procédure dépend de la matrice de l'échantillon, de l'extraction de l'ADN et de la concentration de l'ADN.

13.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA[®] GENE Trichomonas vaginalis concerne *Trichomonas vaginalis*. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 12) :

Tableau 12 : Test de la réactivité croisée










Adenovirus 1, humain, souche Adénoïde 71	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-
Adenovirus 7, humain, souche Gomen	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone 6	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 40, humain, souche Dugan	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 41, humain, souche Tak	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	VHS 1	-	Rotavirus	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	VHS 2	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	VPH 6b	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	VPH 16	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Atopobium vaginae</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	VPH 18	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Mobiluncus curtisii</i> subsp. <i>curtisii</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Mycoplasma fermentans</i>	-	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Norovirus GGI	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	Norovirus GGII	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i>	-						

14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
09/11/2014	Version pour la publication
18/04/2018	Révision générale
18/04/2018	4. Contenu du paquet 6. Autres réactifs et matériel nécessaires 8. Prélèvement et conservation 9. Réalisation du test 13. Performances 14. Historique des versions 15. Signification des symboles

15. Signification des symboles

Symboles généraux

	Pour usage diagnostique <i>in vitro</i>
	Respecter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de stockage
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques au test

Sans objet

16. Bibliographie

1. Sutton M. et al. The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among Reproductive-age women in the United States, 2001-2004. *Clin Infect Disease*, 2007; 45:1319-1326.
2. <https://www.cdc.gov/std/trichomonas/stdfact-trichomoniasis.htm> accessed 18.04.2018
3. Soper D. Trichomoniasis. Under Control or Undercontrolled? *Am J Obstet Gynecol*. 2004; 190:281-290.

RIDA[®] GENE *Trichomonas vaginalis*

REF PG4975

1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA[®] GENE *Trichomonas vaginalis* è un test di PCR real-time multiplex per la determinazione diretta e qualitativa di *Trichomonas vaginalis* da tamponi genitali e da urina umana.

Il kit RIDA[®] GENE *Trichomonas vaginalis* real-time PCR è adatto come ausilio nella diagnosi di tricomoniasi causata da *Trichomonas vaginalis*.

2. Sintesi e spiegazione del test

Trichomonas vaginalis è un parassita patogeno umano che infetta la zona genitale. Può causare tricomoniasi quando sono colpiti entrambi gli organi sessuali o anche il tratto urinario. La tricomoniasi si trasmette per via sessuale attraverso la secrezione vaginale o il liquido seminale, quindi può infettare uomini e donne. In tutto il mondo si registrano circa 120 milioni di casi ogni anno, con un tasso di prevalenza superiore per le donne.¹

Secondo i Centri di Controllo e Prevenzione delle Malattie (CDC), negli Stati Uniti circa 3,7 milioni di persone sono infette da *Trichomonas vaginalis*. Tuttavia, solo il 30% degli infetti mostra dei sintomi.² I sintomi possono variare da una sensazione di disagio nella zona vaginale e durante la minzione fino alle perdite. L'infezione da *Trichomonas vaginalis* nella donna si accompagna spesso a una colonizzazione della flora vaginale con altri patogeni. Ad esempio *Gardnerella vaginalis* oppure altri agenti patogeni fecali accompagnano spesso un'infezione da *Trichomonas vaginalis*. Nelle donne in gravidanza un'infezione da *Trichomonas vaginalis* può portare ad ulteriori complicanze quali parto prematuro o rottura prematura del sacco amniotico.³ Negli uomini le complicanze più comuni sono la sterilità o la prostatite.

Oltre alla colonizzazione della flora vaginale, *Trichomonas vaginalis* svolge anche un ruolo importante come co-fattore durante la trasmissione del virus HIV.² Il gold standard per la diagnosi è ancora la coltura, anche se la sensibilità è solo dell'80% circa e considerati i tempi per ottenere i risultati, che possono arrivare fino a 7 giorni, non è adeguata per una diagnosi tempestiva.

3. Principio del test

RIDA[®]GENE *Trichomonas vaginalis* è un test di PCR real-time per la determinazione diretta e qualitativa di *Trichomonas vaginalis* da tamponi genitali e urina umana.

Dopo l'isolamento del DNA, viene eseguita l'amplificazione del frammento genetico (ITS1, se presente) specifico per *Trichomonas vaginalis*.

Il target amplificato per *Trichomonas vaginalis* viene rivelato con sonde a idrolisi marcate su un'estremità con un quencher e sull'altra con un colorante fluorescente (fluoroforo). In presenza di un target, le sonde ibridano con gli ampliconi. Durante la fase di estensione, la **Taq-Polymerase** rompe la prossimità fra rivelatore (reporter) e attenuatore (quencher). Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rilevato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. RIDA[®]GENE *Trichomonas vaginalis* contiene un **Internal Control DNA** (ICD) quale controllo interno della procedura di preparazione dei campioni e/o per determinare la possibile inibizione della PCR.

4. Contenuto della confezione

Tab. 1: Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni)

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
1	Reaction Mix	2	1050 µl	giallo
2	Taq-Polymerase	1	80 µl	rosso
D	Internal Control DNA	2	1700 µl	arancione
N	No Template Control	1	450 µl	bianco
P	Positive Control	1	200 µl	blu

5. Istruzioni di conservazione

- Proteggere tutti i reagenti dalla luce e conservare a una temperatura di -20 °C. Tutti i reagenti possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Dopo la scadenza la garanzia di qualità non è più valida.
- Scongellare i reagenti con cura e completamente prima dell'uso (es. in un frigorifero a 2-8 °C).
- I reagenti possono sopportare fino a 5 cicli di congelamento/scongellamento senza compromettere i test (ad esempio dopo il primo scongelamento separare il reagente in aliquote e ricongelare immediatamente).
- Durante la preparazione della PCR tutti i reagenti devono essere conservati al freddo in modo appropriato (2-8 °C).

6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari

Il test RIDA[®]GENE Trichomonas vaginalis real-time PCR è adatto per l'uso con le seguenti piattaforme di estrazione e strumenti per la PCR real-time:

Tab. 2: Attrezzatura necessaria

Piattaforme di estrazione	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
bioMérieux	NucliSENS easy [®] MAG [™]
Strumenti per la PCR real-time	
Roche	LightCycler [®] 2.0, LightCycler [®] 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 [™]
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: sullo strumento Rotor-Gene Q (QIAGEN) utilizzare solo provette da 0,1 ml.

Se per la PCR real-time si preferisce utilizzare altre piattaforme di estrazione o strumenti, contattare R-Biopharm all'indirizzo mdx@r-biopharm.de.

- Tamponi sterili, privi di terreno, in fiocco di rayon o nylon (ad esempio Copan Diagnostic Inc., n. di catalogo 155C o 552C)

- RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per l'uso con LightCycler[®] 480II

- RIDA[®]GENE Color Compensation Kit II (PG0002) per l'uso con LightCycler[®] 2.0

- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, provette, fogli)

- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione

- Agitatore a vortice

- Pipette (0,5–20 µl, 20–200 µl, 100–1000 µl)

- Puntali con filtro

- Guanti monouso senza talco

- Acqua per PCR (grado bioscientifico, priva di nucleasi, trattata con DEPC)

7. Precauzioni per gli utilizzatori

Per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi al manuale di istruzioni per l'esecuzione del test. Non pipettare campioni o reagenti con la bocca. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose. Quando si maneggiano reagenti o campioni, indossare abbigliamento di sicurezza adeguato (guanti, camice, occhiali di sicurezza idonei) e lavarsi le mani dopo l'esecuzione del test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.

- L'estrazione, la preparazione della PCR e l'esecuzione della PCR devono avvenire in stanze separate per evitare contaminazione crociata.
- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi, così come tutti i reagenti e i materiali esposti ai campioni, e devono essere maneggiati nel rispetto delle disposizioni di sicurezza nazionali.
- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.

Tutti i reagenti e i materiali utilizzati devono essere smaltiti correttamente dopo l'uso. Attenersi alle disposizioni nazionali in vigore in materia di smaltimento.

Per maggiori informazioni consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo www.r-biopharm.com.

8. Raccolta e conservazione

8.1 Preparazione del DNA

Per l'isolamento del DNA da tamponi asciutti utilizzare un kit (ad es. RIDA[®] Xtract (R. Biopharm)) o un sistema di estrazione disponibile in commercio (ad es. Maxwell[®] RSC (Promega)). Estrarre il DNA in base alle istruzioni del produttore.

Per l'isolamento del DNA dai tamponi asciutti si raccomanda la seguente procedura: Dispensare 400 µl di acqua per PCR in una provetta di preparazione. Inserire il tampone nell'acqua, strizzarlo e tagliare o spezzare il fusto. Chiudere bene la provetta di preparazione, vorticare brevemente e seguire le istruzioni del produttore del kit di estrazione del DNA o del sistema di estrazione del DNA (vedere anche Maxwell[®] RSC Applicazione ER101).

Per l'isolamento del DNA da campioni di urina utilizzare un kit (ad es. RIDA[®] Xtract (R. Biopharm)) o un sistema di estrazione disponibile in commercio (ad es. Maxwell[®] RSC (Promega)). Estrarre il DNA in base alle istruzioni del produttore (vedere anche Maxwell[®] RSC Applicazione ER100).

Il kit RIDA[®] GENE *Trichomonas vaginalis* contiene un Internal Control DNA che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente. L'Internal Control DNA può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR.

Se l' **Internal Control DNA** viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla Master Mix (vedere Tab. 4).

Se l' **Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 20 µl di **Internal Control DNA** durante la procedura di estrazione.

L' **Internal Control DNA** deve sempre essere aggiunto alla miscela tampone di lisi del campione e **non** direttamente ai campioni. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

9. Esecuzione del test

9.1 Preparazione della Master Mix

Calcolare il numero totale di reazioni di PCR (reazioni campione e di controllo) necessarie. Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

Si raccomanda di calcolare un volume aggiuntivo del 10 % a compensazione di un pipettaggio non preciso (vedere Tab. 3, Tab. 4). Prima dell'uso scongelare, miscelare delicatamente e centrifugare brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, il **Positive Control**, il **No Template Control** e l' **Internal Control DNA**. Durante la fase di lavorazione tenere i reagenti adeguatamente refrigerati (2-8 °C).

Tab. 3: Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICD come controllo di estrazione e inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10% extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	Totale	20 µl	220 µl

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

Tab. 4: Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICD solo come controllo di inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10% extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	Totale	21,0 µl	231,0 µl

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

9.2 Preparazione della PCR Mix

Pipettare 20 µl della Master Mix in ogni cuvetta di reazione (provetta o piastra).

Controllo negativo: dispensare 5 µl di **No Template Control** nella Master Mix pre-pipettata.

Nota: se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix del controllo negativo.

Campione: dispensare 5 µl di estratto di DNA alla Master Mix pre-pipettata.

Controllo positivo: dispensare 5 µl di **Positive Control** alla Master Mix pre-pipettata.

Nota: se l'**Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix del controllo positivo.

Coprire le provette o la piastra. Eseguire lo spin down e collocarle nello strumento per PCR real time. La reazione di PCR deve essere avviata in base all'impostazione dello strumento per PCR (vedere Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo PCR real-time per DNA

Tab. 5: Profilo della PCR real-time per la serie LightCycler® e Rotor-Gene Q

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tab. 6: Profilo PCR real-time per Mx3005P, ABI 7500 e CFX96™

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

9.3.2 Profilo PCR real-time universale

Nota: Il profilo della PCR real-time universale deve essere utilizzato per i test del DNA solo quando i test di PCR real-time RIDA® GENE DNA e RIDA® GENE RNA vengono effettuati in un unico ciclo.

Tab. 7: Profilo PCR real-time universale per la serie LightCycler®

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tab. 8: Profilo PCR real-time universale per Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q e CFX96™

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

9.4 Impostazione del canale di rivelazione

Tab. 9: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Nota
Roche LightCycler® 2.0	<i>Trichomonas vaginalis</i>	530	È necessario il RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	<i>Trichomonas vaginalis</i>	465/510	È necessario il RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
ABI 7500	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su
	ICD	VIC	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM	Controllare che non vi sia colorante di riferimento passivo
	ICD	HEX	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Verde	Le impostazioni di amplificazione (gain) devono essere regolate su 5
	ICD	Giallo	
Bio-Rad CFX96™	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM	-
	ICD	VIC	

10. Controllo qualità

L'analisi dei campioni viene eseguita dal software dello strumento per PCR real-time utilizzato, in base alle istruzioni del produttore. Perché l'esecuzione sia valida, il controllo negativo e il controllo positivo devono mostrare i risultati corretti (vedere Tab. 10, Fig. 1).

Il **Positive Control** ha una concentrazione di 10^3 copie/ μ l. In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di 5×10^3 copie.

Tab. 10: Perché l'esecuzione sia valida occorre che siano soddisfatte le seguenti condizioni:

Campione	Risultato del test	Ct ICD	Ct Target
Controllo positivo	Positivo	NA * ¹	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	0

*¹ Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICD.

Se il controllo positivo non è positivo nel range Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se i criteri richiesti non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test

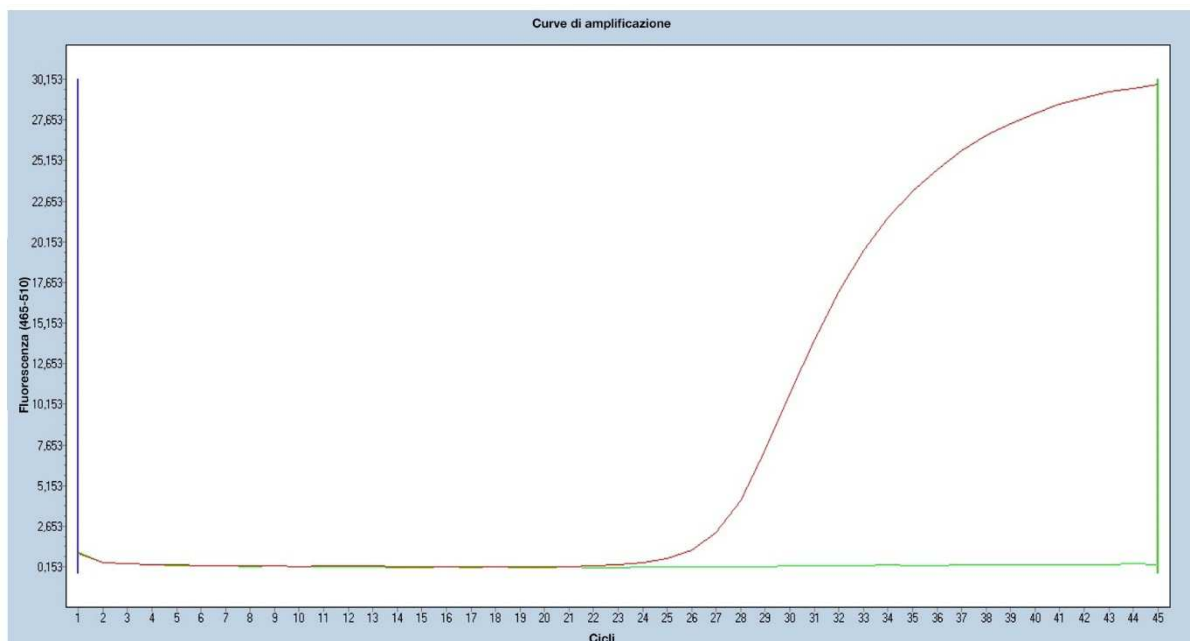


Fig.1: Esecuzione corretta del controllo positivo e del controllo negativo (*Trichomonas vaginalis*) sul LightCycler® 480II

11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tab. 11.

Tab. 11: Interpretazione del campione

Geni target		
<i>T. vaginalis</i>	ICD	Risultato
positivo	positivo/negativo	<i>Trichomonas vaginalis</i> rivelato
negativo	positivo	Gene target non rivelato
negativo	negativo	Non valido

Trichomonas vaginalis è comprovabile se sia il DNA del campione sia l'**Internal Control DNA** mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

Trichomonas vaginalis è inoltre comprovabile se il DNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma nessun segnale per l'**Internal Control DNA** nel sistema di rivelazione. La rivelazione del controllo di amplificazione interno non è necessaria, in quanto elevate concentrazioni dell'amplicone possono far sì che il segnale dell'**Internal Control DNA** sia debole o assente.

Trichomonas vaginalis non è comprovabile se il DNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione, ma nel sistema di rivelazione è presente un segnale per l'Internal Control DNA. La rivelazione dell'Internal Control DNA esclude l'inibizione della reazione di PCR.

Un campione non è valido se né il DNA del campione né l'Internal Control DNA mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rivelazione. In questo caso il campione contiene un inibitore della PCR o si è verificato un errore nella procedura di estrazione. Il campione estratto deve essere ulteriormente diluito con acqua per PCR (1:10) e ri-amplificato, oppure occorre migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

12. Limiti del metodo

1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è convalidato solo per i tamponi genitali umani e i campioni di urina.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti patogeni nei campioni al di sotto della sensibilità analitica possono produrre falsi negativi.
4. La presenza di inibitori della PCR può causare risultati non validi.
5. Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame del primer o della sonda possono influenzare la rivelazione di nuove varianti e causare un falso negativo con il test RIDA[®]GENE *Trichomonas vaginalis*.
6. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, livelli estremamente bassi di target sotto il limite di rivelabilità (LoD) possono essere rivelati, ma i risultati potrebbero non essere riproducibili.
7. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza del gene target (ITS1).

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Sensibilità analitica

Il test RIDA® GENE *Trichomonas vaginalis* di PCR real-time multiplex ha un limite di rivelazione maggiore o uguale a 10 copie di DNA per reazione. La figura 2 seguente mostra una serie di diluizioni di *Trichomonas vaginalis* ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl) su LightCycler® 480II

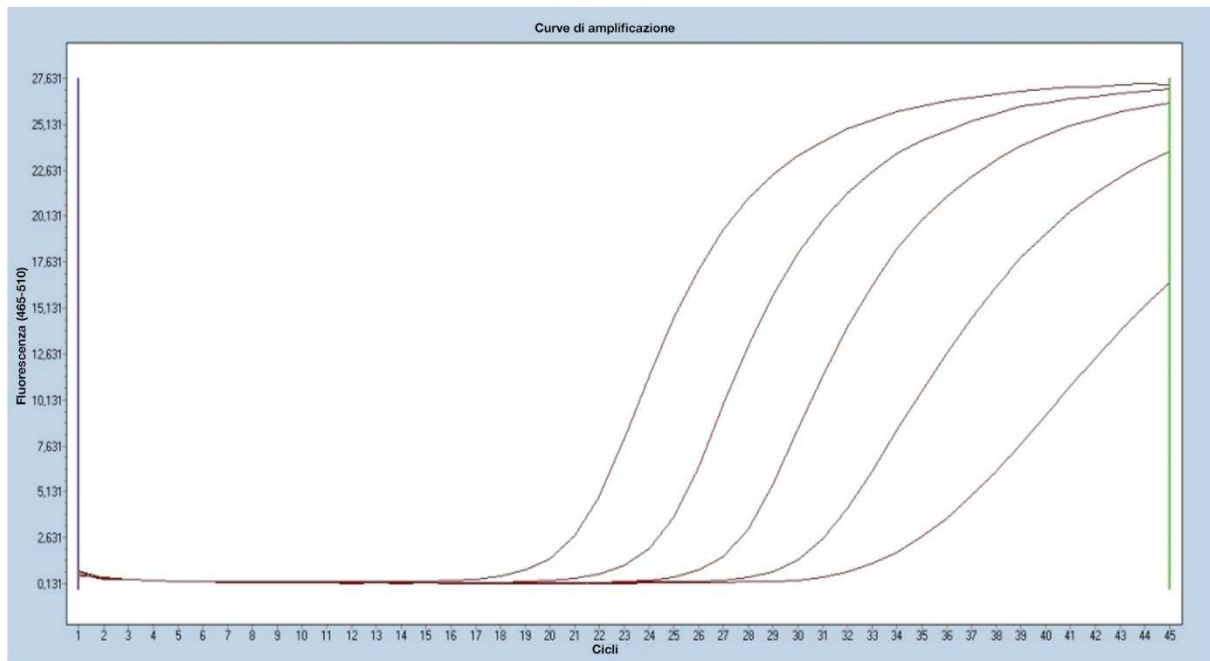


Fig. 2: Serie di diluizioni di *Trichomonas vaginalis* ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl) su LightCycler® 480II

Il limite di rivelabilità dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione del DNA e dalla concentrazione del DNA.

13.2 Specificità analitica

La specificità analitica del test RIDA® GENE *Trichomonas vaginalis* di PCR real-time multiplex è specifica per *Trichomonas vaginalis*. Non è stata rilevata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tab. 12):

Tab. 12: Test di reattività crociata










Adenovirus 1, umano, ceppo Adenoid 71	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-
Adenovirus 7, umano, ceppo Gomen	-	<i>Clostridium bifirmentans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone 6	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 40, umano, ceppo Dugan	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 41, umano, ceppo Tak	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	HSV 1	-	Rotavirus	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	HSV 2	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	HPV 6b	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	HPV 16	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Atopobium vaginae</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	HPV 18	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Mobiluncus curtisii</i> sottosp. <i>curtisii</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> sottosp. <i>fetus</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Mycoplasma fermentans</i>	-	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> sottosp. <i>lari</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Norovirus GGI	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	Norovirus GGII	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i>	-						

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2014-11-09	Versione di rilascio
2018-04-18	Revisione generale
2018-04-18	4. Contenuto della confezione 6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari 8. Raccolta e conservazione 9. Esecuzione del test 13. Prestazioni e caratteristiche 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione dei simboli

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Diagnostica <i>in vitro</i>
	Leggere il foglio illustrativo
	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici nel testo

Non pertinente

16. Bibliografia

1. Sutton M. et al. The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among Reproductive-age women in the United States, 2001-2004. *Clin Infect Disease*, 2007; 45:1319-1326.
2. <https://www.cdc.gov/std/trichomonas/stdfact-trichomoniasis.htm> accessed 18.04.2018
3. Soper D. Trichomoniasis. Under Control or Undercontrolled? *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 190:281-290.