



***Trichomonas vaginalis* PCR kit**

Real-Time PCR Testkit zur Detektion von *Trichomonas vaginalis* DNA in klinischen Proben

(Gebrauchsanweisung: Seite 5)

Real Time PCR test for detection of *Trichomonas vaginalis* DNA in clinical materials

(Instructions for use: page 17)



Form S 84-05










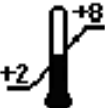












Form T 84-06



112 Untersuchungen

112 tests

1. KENNZEICHEN/ SYMBOLS LEGEND

	In Vitro Diagnostika In Vitro Diagnostic Medical Device		EG-Konformitätserklärung EC Declaration of Conformity
	Bestellnummer Catalogue number		Chargenbezeichnung Batch code
	Verwendbar bis Use by		Hersteller Manufacturer
	Herstellungsdatum Date of manufacture		Gebrauchsanweisung beachten Consult operating instructions
	Achtung, Begleitdokumente beachten Caution, consult accompanying documents		Temperaturbegrenzung Temperature limitation
	Ausreichend für <112> Prüfungen Contains sufficient for <112> tests		PCR Mix S-TV
	Taq DNA Polymerase Taq DNA-polymerase		PCR-Mix T-TV
	Negativkontrolle Negative Control		Positivkontrolle Positive Control
	Biogefährdung Biological risks		Interne Kontrolle Internal Control
	Sehr giftig Very toxic		Gewässergefährdend Dangerous for the environment
	Lichtgeschützt Protect from light		Trocken halten Keep dry

2. VERWENDUNGSZWECK

Der ***Trichomonas vaginalis* PCR Testkit** ist für eine schnelle und qualitative Detektion von *Trichomonas vaginalis* (TV) DNA in Abstrichen der urethralen, endozervikalen und vaginalen Schleimhaut, Urinproben, Prostatasekret und anderen humanen Körperflüssigkeiten sowie Gewebeproben mittels Real-Time PCR zur Diagnose der Trichomoniasis bestimmt.

3. TESTPRINZIP

Die Durchführung des ***Trichomonas vaginalis* PCR Testkits** umfasst zwei Schritte: DNA Extraktion und PCR Amplifikation.

Zunächst wird die DNA Extraktion der Probe unter Zugabe der Internen Kontrolle **IC** durchgeführt. **IC** ist im ***Trichomonas vaginalis* PCR Testkit** enthalten und wird jeder Reaktion -zur Kontrolle der DNA Extraktion und PCR Amplifizierungsschritte- zugegeben.

Darauffolgend wird die *Trichomonas vaginalis* DNA mit der Real-Time PCR detektiert. Während der Real-Time PCR werden sowohl Fragmente genomischer DNA von *Trichomonas vaginalis* als auch der **IC** DNA amplifiziert und gleichzeitig detektiert. Die Amplifikation führt zu einem Anstieg der Hybridisierung der Fluoreszenzsonden mit der *Trichomonas vaginalis* DNA und den **IC** DNA Amplifikaten.

Durch die Exonuklease-Aktivität der Taq DNA Polymerase **Taq** werden die Oligonukleotidsonden degradiert und die Fluorophorgruppe vom Quencher getrennt.

Der Effekt des Quenchers erlischt und die entstehende Fluoreszenzemission kann mittels Real-Time PCR Thermocycler detektiert und gemessen werden.

Die Präsenz der Ziel-DNA in der Probe wird mit den resultierenden Quantifizierungszyklen (=Cq) („Threshold Cycle“ (Ct) oder Kreuzungspunkten (Cp)) belegt.

Die eingesetzte “hot start” Taq DNA Polymerase **Taq** erhöht zudem die Sensitivität und Spezifität des Testkits.

4. PACKUNGSGEHALT

4.1 Format S (Flüssige Reaktionsmische aliquotiert in 0.2 ml 8-Well-Streifen, DNA Polymerase separat)

Label	Komponente	Volumen, µl	Anzahl
S PCR-TV	PCR Mix S-TV	10	14x 8x0,2 ml Röhrchen
Taq	Taq DNA Polymerase	1120	1 Röhrchen
PC	Positivkontrolle	250	1 Röhrchen
IC	Interne Kontrolle	1120	2 Röhrchen
NC	Negativkontrolle	1500	1 Röhrchen

Dieses Format ist kompatibel mit den PCR Amplifikatoren: CFX96, CFX96 Touch, SaCycler, Light Cycler 96 und anderen Amplifikatoren, die mit flachen Röhrchen kompatibel sind.

4.2 Format T (Flüssige Reaktionsmische aliquotiert in 0.2 mL Röhren, DNA Polymerase separat)

Label	Komponente	Volumen, μ l	Anzahl
T PCR-TV	PCR Mix T-TV	10	112×0,2 ml Röhren
Taq	Taq DNA Polymerase	1120	1 Röhren
PC	Positivkontrolle	250	1 Röhren
IC	Interne Kontrolle	1120	2 Röhren
NC	Negativkontrolle	1500	1 Röhren

Dieses Format ist kompatibel mit den PCR Amplifaktoren: Rotor-Gene 3000/6000 und Rotor-Gene und anderen Amplifaktoren, die mit Standard Röhren kompatibel sind.

5. ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN UND EQUIPMENT

- Biosicherheitskammer;
- Real-Time PCR Thermocycler;
- Vortex;
- Mikrozentrifuge (passend für 0,2 ml Röhren, max. 2400 rpm);
- 2 separate Pipettensätze für DNA-freie und DNA-haltige Komponenten;
- Filterspitzen (10, 100, 200, 1000 μ l);
- Sterile, transparente 0,2 ml Mikrozentrifugenröhren/ Mikrotiter-Streifen/ PCR Platten kompatibel mit verwendetem Real-Time PCR Thermocycler;
- Einweg 1,5 ml-„Safe-seal“-Mikrozentrifugenröhren;
- Separate Arbeitsbereiche zur DNA Extraktion, PCR Präparation und PCR Amplifikation mit je eigenem Pipettensatz, Equipment und Laborkleidung.

6. LAGERUNG UND STABILITÄT DES TESTKITS

Der Testkit ist für 112 Reaktionen inklusive der Kontrollen bestimmt.

Der *Trichomonas vaginalis* PCR kit sollte bei +2...+8°C, vorzugsweise in der Originalverpackung bis zum Verfallsdatum gelagert werden.

Das Verfallsdatum des Kits ist auf der Packung und das Verfallsdatum für jede Komponente auf dem jeweiligen Etikett angegeben. Eine Lagerung bei +25 °C ist für maximal 7 Tage zulässig (alle Formate).

7. PROBEN

Gesamt DNA kann aus Abstrichen der urethralen, endozervikalen und vaginalen Schleimhaut, Urinproben, Prostatasekret und anderen humanen Körperflüssigkeiten sowie Gewebeproben extrahiert werden. Es können alle Extraktionsmethoden genutzt werden.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Negative Kontrollen müssen bei jedem Lauf mitgeführt werden.

Der komplette Ablauf besteht aus drei Schritten:

1. DNA Extraktion
2. Real-Time PCR
3. Datenanalyse und Interpretation

1. DNA Extraktion

ANMERKUNG: Die Anwendung der Astra Biotech DNA Extraktionskits zur Probenvorbereitung wird ausdrücklich empfohlen.

1.1 **IC** herausnehmen und restliche Komponenten zurück in den Kühlschrank stellen. **IC** vorsichtig vortexen und vor dem Gebrauch für 2-3 s zentrifugieren.

1.2 1,5 ml Reaktionsgefäße entsprechend der Probenanzahl bereitstellen +1 Röhrchen für die Negative Extraktionskontrolle vorbereiten und mit „NEC“ markieren.

ANMERKUNG: Jede Extraktion erfordert das Mitführen der „NEC“.

1.3 Bei Verwendung des Astra Biotech DNA Extraktionskits Schritte 1.4 bis 1.6 ignorieren und der Gebrauchsanweisung des Extraktionskits folgen, sonst mit 1.4 fortsetzen.

1.4 20 µl **IC** in jedes 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettieren.

1.5 100 µl **NC** in das mit “NEC” markierte Gefäß geben.

ANMERKUNG: Anstelle der **NC** kann Elutionspuffer, der im Extraktionskit enthalten ist, verwendet werden.

1.6 Der Gebrauchsanweisung des jeweiligen Extraktionskits folgen.

ANMERKUNG: Das Elutionsvolumen sollte 200 µl nicht überschreiten.

2. Real-Time PCR

2.1 Vorbereitung der Kitkomponenten:

- Testkit aus dem Kühlschrank nehmen, flüssige Komponenten auftauen, vortexen und kurz zentrifugieren.

2.2 Vorbereitung der Mikrozentrifugenröhrchen:

- Benötigte Menge 0,2 ml Mikrozentrifugenröhrchen /Kavitäten entsprechend der Probenanzahl bereitstellen und markieren + 1 Röhrchen/ Kavität für „PC“ (Positivkontrolle) + 1 Röhrchen/ Kavität für „NEC“ (Negative Extraktionskontrolle).

ANMERKUNG: *Unterschiedliche Positionen für die Beschriftung der Röhrchen sind aufgrund unterschiedlicher Arten der Fluoreszenzdetektion nötig: Bei Verwendung der Real-Time PCR Thermocycler CFX96, CFX96 Touch oder SaCycler sind die Röhrchen außerhalb der Deckelmitte oder am Röhrchenrand zu markieren. Bei Verwendung der Real-Time PCR Thermocycler Rotor-Gene 3000/ 6000 oder Rotor-Gene Q Instrumente sind die Röhrchen auf dem Deckel zu markieren.*

- **10 µl Taq** in jedes 0,2 ml **Röhrchen/ Kavität** pipettieren dabei Paraffin-Kontakt vermeiden.
- **10 µl DNA** (extrahiert aus Patientenprobe und „NEC“) hinzufügen (Paraffin-Kontakt vermeiden).
- Für jede Probe eine separate Filterspitze verwenden.
- **10 µl** Positivkontrolle **PC** in das mit „PC“ markierte **Röhrchen/ Kavität** pipettieren.
- Gefäße schließen.
- **2-3 s** bei **1500-2400 rpm** zentrifugieren.

2.3 Real-Time PCR

- Röhrchen/ Platte in den Real-Time PCR Thermocycler stellen.
- Platteninformation eingeben. Einrichten der Fluoreszenzdetektion mit den Kanälen ROX / Orange und FAM / Grün.
- PCR Protokoll für alle PCR Thermocycler starten:

Schritt	Temperatur, °C	Daten Erhebung	Zeit	Nummer der Zyklen
Halten	94	-	3 min	1
PCR	94	-	10 s	5
	60		20 s	
PCR	94	-	10 s	45
	60	ROX/ Orange FAM/ Green	20 s	

3. Datenanalyse

3.1 Allgemeines:

Quantifizierungszyklen (= Cq) werden in allen Proben sowohl für FAM als auch ROX bestimmt. Der ROX-Farbstoff wird für die Detektion der *Trichomonas vaginalis* (TV) DNA und FAM für die Detektion der **IC** DNA genutzt.

Die Testergebnisse des Laufes sind gültig, wenn Cq_{ROX} von „PC“ innerhalb des im Qualitätskontrolldatenblatt zum Produkt beschriebenen Bereiches liegt.

Eine Kontamination ist präsent, wenn Cq_{ROX} „NEC“ < Cq TV (siehe Qualitätskontrolldatenblatt).

In diesem Fall sollten alle Proben, die als positiv in diesem Lauf detektiert wurden, als ungültig betrachtet werden. Diese Proben sind ab dem Schritt der DNA Extraktion erneut zu messen.

3.2 Interpretation der Daten:

Cq _{ROX/ Orange}	Cq _{FAM/ Grün}	Interpretation
Detektion der TV DNA	Detektion der IC DNA	
> Cq TV oder N/A	≤ Cq IC	Negativ
≤ Cq TV	ALLE	Positiv
> Cq TV oder N/A	> Cq IC oder N/A	Ungültig; originale Probe oder neu isolierte Probe erneut analysieren

Abkürzungen:

Cq TV= kritischer Wert des Quantifizierungszyklus für *Trichomonas vaginalis*

Cq **IC** = kritischer Wert des Quantifizierungszyklus der Internen Kontrolle

N/A = Cq Wert kann nicht bestimmt werden

9. TESTCHARAKTERISTIKA

Analytische Sensitivität:

Das Detektionslimit des Testkits wurde via Probitanalyse ermittelt und beträgt 480 Kopien der genomischen DNA von *Trichomonas vaginalis* pro 1 ml. Dieses Limit ist für das Konfidenzniveau von 99% definiert.

Analytische Spezifität:

Falsch-positive Ergebnisse mit humaner Standard DNA und Standard DNA Proben von *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas foetus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* sp., *Ureaplasma* sp., *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus* konnten nicht nachgewiesen werden.

10. GRENZEN DER METHODE

Jede klinische Diagnose sollte auf den Resultaten mehrerer in-vitro-diagnostischer Methoden beruhen. Zur Erstellung einer Diagnose sollte der Arzt alle verfügbaren klinischen und Laborbefunde berücksichtigen.


11. VORSICHTSMAßNAHMEN

- **Der Testkit ist ausschließlich zum in vitro–Gebrauch bestimmt.** Um zuverlässige Testergebnisse zu erhalten, ist die Arbeitsanleitung strikt einzuhalten. Diese Gebrauchsanweisung ist nur für den vorliegenden Testkit mit dem aufgeführten Inhalt gültig. Jeglicher Austausch der Kitkomponenten ist durch die CE-Regularien nicht gestattet.
- Der Testkit ist nur durch geschultes Personal entsprechend der GLP Richtlinien (Gute Laborpraxis) durchzuführen.
- Der Testkit darf nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.

- Das Mischen von Reagenzien verschiedener Chargen oder aus verschiedenen Gefäßen derselben Charge ist nicht erlaubt (die einzige Ausnahme für **IC** ist im Folgenden beschrieben). Unmittelbar nach Gebrauch sind alle Gefäße zu verschließen, um ein Verlust zu vermeiden. Nach dem Öffnen sind alle Gefäße im Stehen zu lagern.
- Bei Verwendung mehrerer Astra Biotech PCR Infektionskits zur Detektion verschiedener Infektionserreger darf die **IC** mit der jüngsten Chargennummer für alle diese verschiedenen Kits verwendet werden.
- Wir empfehlen, vor jeder Analyse ein PCR Protokoll zu erstellen.
- Die PCR Technologie ist sehr empfindlich. Die Amplifikation eines einzelnen DNA Moleküls generiert Millionen identischer Kopien. Es ist daher ratsam, drei getrennte Arbeitsbereiche einzurichten: a) Proben Aufbereitung und b) PCR Reagenzien-Vorbereitung und c.) PCR-Amplifikation. Jeder Arbeitsbereich benötigt ein eigenes Set an Pipetten und Arbeitsschutzkleidung.
- Sterile Pipettenspitzen und für PCR sterile Filter-Pipettenspitzen zum aerosolfreien Pipettieren nutzen.
- Dieselben Pipettenspitzen nie für zwei verschiedene Komponenten benutzen, weder DNA-frei noch DNA-haltig.
- Im Labor nicht essen, trinken oder rauchen.



- Alle Komponenten des ***Trichomonas vaginalis*** **PCR kits** enthalten 0,05 % Natriumazid, welches als sehr giftig und gewässergefährdend eingestuft wird. Die folgenden Vorsichtsmaßnahmen müssen beachtet werden:
 - P260- Staub/ Rauch/ Gas/ Nebel/ Dampf/ Aerosol nicht einatmen;
 - P262- Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen;
 - P264- Nach Gebrauch Hände gründlich waschen;
 - P270- Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen;
 - P271- Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden;
 - P273- Freisetzung in die Umwelt vermeiden;
 - P280- Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen;
 - P284- Atemschutz tragen;
 - P310- Sofort Giftnformationszentrum oder Arzt anrufen;
 - P320- Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe Gebrauchsanweisung);
 - P321- Besondere Behandlung (siehe Gebrauchsanweisung);
 - P322- Gezielte Maßnahmen (siehe Gebrauchsanweisung);
 - P330- Mund ausspülen;
 - P361- Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen;
 - P363- Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen;
 - P391- Verschüttete Mengen aufnehmen;
 - P405- Unter Verschluss aufbewahren;

- P501- Inhalt / Behälter entsprechend den geltenden nationalen Bestimmungen der Entsorgung zuführen;
 - P301 +P310- BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen;
 - P302 +P350- BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen;
 - P304 +P340- BEI EINATMEN: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert;
 - P403 +P233- Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- Ein vorsichtiger Umgang mit der Positivkontrolle ist nötig, das Spritzen ist zu vermeiden.
 - Testkits, kontaminiert mit *Trichomonas vaginalis* DNA/ **PC** sind im infektiösen Müll zu entsorgen.
 - Routinemäßig sind die Pipetten und der Arbeitsbereich zu dekontaminieren.
 -  Bei der DNA Extraktion von klinischen Proben sind Praktiken und Verfahren der Biologischen Sicherheitsstufe 2 zu befolgen. Humanes Blut, Blutprodukte, Körperflüssigkeiten und Gewebe sollten immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
 - Nach dem Gebrauch sind alle Reagenzien und Komponenten entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien zu entsorgen.

2. INTENDED USE

The ***Trichomonas vaginalis* PCR kit** is provided for fast and qualitative detection of *Trichomonas vaginalis* (TV) DNA in urethral swab specimens, endocervical and vaginal smears, urine samples, prostatic fluid specimens and other human body fluids and tissue samples by means of Real-Time PCR for diagnosis of trichomoniasis.

3. PRINCIPLE OF TEST

The performance of the ***Trichomonas vaginalis* PCR kit** includes two stages: DNA extraction and PCR amplification.

At first DNA extraction from specimen with addition of Internal Control **IC** is performed. **IC** is provided with ***Trichomonas vaginalis* PCR kit** and is added to each reaction controlling both DNA extraction and PCR amplification stages.

The second stage is the Real-Time PCR to detect the DNA of *Trichomonas vaginalis*. During the Real-Time PCR the fragments of *Trichomonas vaginalis* genomic DNA and **IC** DNA are both amplified and detected simultaneously. The amplification causes the increase of hybridization of fluorescent reporter probes with *Trichomonas vaginalis* DNA and **IC** DNA amplicons.

The exonuclease activity of the Taq DNA-polymerase degrades oligonucleotide probes and separates the fluorophore from the quencher, thus cancelling quenching effect and allowing emission of fluorescence detected and measured by Real-Time PCR machine. Therefore, resulting quantification cycle, C_q, (threshold cycle (C_t) or crossing point (C_p)) is used to determine the presence of target DNA in the sample.

The “hot start” Taq DNA-polymerase **Taq** improves sensitivity and specificity of the test.

4. MATERIALS PROVIDED

4.1 Format S (aliquoted into 0.2 mL 8-tube strips liquid reaction mix and separate DNA polymerase)

Label	Component	Volume, μL	Quantity
S PCR-TV	PCR-Mix S-TV	10	14x8x0.2 mL tubes
Taq	Taq DNA polymerase	1120	1 tube
PC	Positive Control	250	1 tube
IC	Internal Control	1120	2 tubes
NC	Negative Control	1500	1 tube

The format is compatible with the following amplifiers: CFX96/CFX90 Touch and SaCycle, Light Cycler 96 and other Real-Time PCR cyclers that are compatible with low profile tubes.

4.2 Format T (aliquoted into 0.2 mL reaction tubes liquid reaction mix and separate DNA polymerase)

Label	Component	Volume, μL	Quantity
T PCR-TV	PCR-Mix T-TV	10	112x0.2 mL tubes
Taq	Taq DNA polymerase	1120	1 tube
PC	Positive Control	250	1 tube
IC	Internal Control	1120	2 tubes
NC	Negative Control	1500	1 tube

The format is compatible with the following amplifiers: Rotor-Gene 3000/6000 and Rotor-Gene Q and other Real-Time PCR cyclers that are compatible with regular profile tubes.

5. MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Biosafety cabinet;
- Real-Time PCR cycler;
- Vortex mixer;
- Microcentrifuge (suitable for 0.2 mL tubes, max. 2400 rpm);
- 2 separate pipette sets for DNA-free and DNA-containing components;
- Filter tips (10, 100; 200 and 1000 μ L);
- Sterile optically clear 0.2 mL microcentrifuge tubes/ strip tubes/ PCR plates suitable for Real-Time PCR system used;
- Disposable safe-seal 1.5 mL microcentrifuge tubes
- Separate working areas for DNA extraction, PCR preparation and PCR amplification each with set of pipettes, instruments and laboratory clothing.

6. STORAGE CONDITIONS AND STABILITY OF THE KIT

The kit is designed to perform 112 reactions, including controls.

***Trichomonas vaginalis* PCR kit** should be stored at +2...+8°C, preferably in the original kit box until the expiration date.

The expiry date of the kit is stated on the box label, expiry date for each component is indicated on the respective label.

Storage at +25 °C is allowed for no more than 7 days (any kit format).

7. SAMPLES

Total DNA can be extracted from urethral swab specimens, endocervical and vaginal smears, urine samples, prostatic fluid specimens and other human body fluids and tissue samples. All methods of extraction can be used.

8. ASSAY PROCEDURE

Negative Controls must be included in each run.

The complete procedure consists of three stages:

1. DNA Extraction
2. Real-Time PCR
3. Data analysis and interpretation

1. DNA extraction

NOTE: Application of Astra Biotech DNA extraction kits for specimen preparation is strongly recommended.

1.1 Take **IC** and place the rest components back in refrigerator. Gently vortex **IC** and centrifuge for 2-3 s.

1.2 Prepare and mark required quantity of 1.5 mL microcentrifuge tubes equal to the number of samples + 1 tube for negative extraction control and label as “NEC”.

NOTE: Each extraction procedure should be performed using “NEC”.

1.3 If Astra Biotech DNA extraction kit is used, ignore steps 1.4 –1.6 and follow the Astra Biotech DNA extraction kit manual; otherwise continue from step 1.4.

1.4 Place **20 µL IC** into each 1.5 mL microcentrifuge tube.

1.5 Add **100 µL NC** into the microcentrifuge tube marked “**NEC**”.

NOTE: The Elution buffer contained in DNA extraction kit could be used instead of **NC**.

1.6 Follow the manual of respective DNA extraction kit.

NOTE: Elution volume should not exceed 200 µL.

2. Real-Time PCR

2.1 Kit components preparation:

- Take the kit out from the refrigerator. Gently vortex all liquid components and centrifuge briefly.

2.2 Microcentrifuge tubes preparation:

- Prepare and mark required quantity of 0.2 mL microcentrifuge tubes/ wells equal to the number of samples + 1 tube/ well for “PC” + 1 tube/ well for “NEC”.

NOTE: Different positions for marking the tubes are necessary because of differences in the fluorescence detection: When using CFX96, CFX96Touch or SaCycler Real-Time PCR cyclers mark microcentrifuge tubes outside the centre of tube cap or on the tube side. When using Rotor-Gene 3000/6000 or Rotor-Gene Q instruments mark the tubes on the caps.

- Place **10 µL Taq** into each reaction tube avoiding tip contact with paraffin.

- Add **10 µL DNA** (extracted from specimens and “NEC”) avoiding tip contact with paraffin. Use separate filter tip for each sample.
- Add **10 µL positive control** **PC** in the **PCR tube marked “PC”**
- Close the tubes.
- Centrifuge at **1500-2400 rpm for 2-3 s.**

2.3 Real-Time PCR Amplification:

- Place tubes/ plate into the Real-Time PCR cycler.
- Complete the plate information. Set up fluorescent detection from channels ROX/ Orange and FAM/ Green.
- Run PCR protocol for all thermal cyclers:

Stage	Temperature, °C	Data collection	Time	Number of cycles
Hold	94	-	3 min	1
Cycling	94	-	10 s	5
	60		20 s	
Cycling	94	-	10 s	45
	60	ROX/ Orange FAM/ Green	20 s	

3. Data Analysis

3.1 General conditions:

Quantification cycles (= Cq) are determined for both FAM and ROX dyes in all samples. ROX dye is used to detect the *Trichomonas vaginalis* DNA and FAM is used to detect **IC** DNA.

The results of single run are valid if Cq_{ROX} "PC" is within the range determined in the quality control sheet to the product.

A contamination is present if Cq_{ROX} "NEC" < Cq TV (see quality control sheet). In that case all the specimens tested as positive in this run should be considered invalid. Process all these specimens again from the DNA extraction stage.

3.2 Data interpretation:

Cq _{ROX/ Orange} Detection of TV DNA	Cq _{FAM/Green} Detection of IC DNA	Interpretation
> Cq TV or N/A	≤ Cq IC	Negative
≤ Cq TV	ANY	Positive
> Cq TV or N/A	> Cq IC or N/A	Invalid, run the original specimen again or process new collected one

Abbreviations:

Cq TV= critical value of quantification cycle for Trichomonas vaginalis

*Cq **IC** = critical value of quantification cycle for Internal Control*

N/A = Cq value cannot be determined

9. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE KIT

Analytical sensitivity:

The detection limit of the kit evaluated via probit analysis is 480 copies of *Trichomonas vaginalis* genomic DNA per 1 mL. This limit is defined for confidence level of 99%.

Analytical specificity:

A false-positive reaction is absent with standard human DNA samples and standard DNA samples of *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas foetus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* sp., *Ureaplasma* sp., *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus*.

10. LIMITATIONS OF THE METHOD

Any clinical diagnosis should not be based on the results of *in vitro* diagnostic methods alone. For diagnosis establishment a physician is supposed to consider all the available clinical and laboratory findings.


11. SAFETY PRECAUTIONS

- **This kit is for in vitro diagnostic use only.** The operator should thoroughly follow the manual to obtain reliable data. This instruction manual is valid only for the present kit with the listed contents. Any exchange of the kit components is not allowed by CE regulations.

- Test should only be performed by skilled personnel considering GLP (Good Laboratory Practice) guidelines.
- Don't use the kit after its expiration date.
- Do not pool reagents from different lots or from different bottles of the same lot (the only exception for **IC** is described below). Immediately after use, close all bottles in order to avoid leakage. After opening, store all bottles and vials in an upright position.
- In case of simultaneous using of two or more Astra Biotech Infectious Real-Time PCR kits for detection of different infectious agents, **IC** with the latest lot number can be used for all of these kits.
- We recommend setting up blank protocols of PCR before the analysis.
- PCR technology is extremely sensitive. The amplification of a single DNA molecule generates millions of identical copies. Therefore, set up three separate working areas for a) sample preparation b) PCR reagent preparation and c) PCR amplification. For each working area a different set of pipettes and protective clothing should be reserved.
- Use sterile filter tips for pipetting and use special PCR pipettes for aerosol free pipetting.
- Do not use the same tip for two different components, neither DNA-free nor DNA containing.
- Do not eat, drink or smoke in the laboratory work area.



- All components of ***Trichomonas vaginalis* PCR kit** contain 0.05 % of sodium azide, which is very toxic and dangerous to environment:
 - P260- Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapours/spray;
 - P262- Do not get in eyes, on skin, or on clothing;
 - P264- Wash hands thoroughly after handling;
 - P270- Do not eat, drink or smoke when using this product;
 - P271- Use only outdoors or in a well-ventilated area;
 - P273- Avoid release to the environment;
 - P280- Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/ face protection;
 - P284- Wear respiratory protection;
 - P310- Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician;
 - P320- Specific treatment is urgent (see instruction for use);
 - P321- Specific treatment (see instruction for use);
 - P322- Specific measures (see instruction for use);
 - P330- Rinse mouth;
 - P361- Remove/Take off immediately all contaminated clothing;
 - P363- Wash contaminated clothing before reuse;
 - P 391- Collect spillage;
 - P405- Store locked up;
 - P501- Dispose of contents/container in accordance with national regulation;
 - P301 +P310- IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician;

- P302 +P350- IF ON SKIN: Gently wash with plenty of soap and water;
 - P304 +P340- IF INHALED: Remove victim to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing;
 - P403 +P233- Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed.
-
- Be careful while handling Positive Control, avoid its splashing.
 - Kits contaminated with *Trichomonas vaginalis* DNA/ **PC** should be discarded in a biological waste container.
 - Routinely decontaminate your pipettes and the laboratory benches.
 -  During DNA extraction of clinical materials, **biosafety level 2 practices and procedures** have to be followed. Human blood, blood products, body fluids and tissues should be treated as potential infectious.
 - After usage, all the reagents and test components should be discarded as consisted with local statements.

June 22, 2017



Astra Biotech GmbH
Rudower Chaussee 29
12489 Berlin, Germany
Telefon: +49 (0)30 74 696 509
E-Mail: info@astrabiotech.de
www.astrabiotech.de