

Real Time PCR Detection Kit

HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum Assay
for BD MAX™ System

Gebrauchsanweisung

CE IVD
2797

Die vorliegende Gebrauchsanweisung bezieht sich auf die folgenden Referenzen:

PRODUKT	REFERENZ
VIASURE HSV-1, HSV-2 & <i>Treponema pallidum</i> Assay for BD MAX™ System	444222

Tabelle A 1. Verweis auf das mit dem System BD MAX™ zu verwendende Produkt.

EN For download IFUS from other languages, please enter in certest.es/viasure/labeling. Once you be there, please following the instructions for access to the language that you need. If you need additional information, please contact: viasure@certest.es.

BG За да изтеглите IFUS на други езици, моля, отидете на certest.es/viasure/labeling. След това следвайте инструкциите, за да получите достъп до необходимия ви език. Ако имате нужда от допълнителна информация, моля, свържете се с: viasure@certest.es.

CS Chcete-li si stáhnout IFUS v jiných jazycích, přejděte na stránku certest.es/viasure/labeling. Jakmile se tam dostanete, postupujte podle pokynů pro přístup k požadovanému jazyku. Pokud potřebujete další informace, kontaktujte prosím: viasure@certest.es.

DA Hvis du vil downloade IFUS på andre sprog, kan du gå til certest.es/viasure/labeling. Når du er der, skal du følge instruktionerne for at få adgang til det sprog, du har brug for. Hvis du har brug for yderligere oplysninger, kan du kontakte: viasure@certest.es.

DE Um den IFUS in anderen Sprachen herunterzuladen, gehen Sie bitte zu certest.es/viasure/labeling. Wenn Sie dort sind, folgen Sie den Anweisungen, um auf die gewünschte Sprache zuzugreifen. Wenn Sie weitere Informationen benötigen, wenden Sie sich an: viasure@certest.es.

EL Για να κατεβάσετε το IFUS σε άλλες γλώσσες, μεταβείτε στη διεύθυνση certest.es/viasure/labeling. Μόλις φτάσετε εκεί, ακολουθήστε τις οδηγίες για να αποκτήσετε πρόσβαση στη γλώσσα που χρειάζεστε. Εάν χρειάζεστε πρόσθετες πληροφορίες, επικοινωνήστε με τη διεύθυνση: viasure@certest.es.

ES Para descargar las IFUS en otros idiomas, por favor, entre en certest.es/viasure/labeling. Una vez esté allí, siga las instrucciones para acceder al idioma que necesite. Si necesita información adicional, contacte: viasure@certest.es.

ET IFUSi allalaadimiseks teistes keeltes külastage certest.es/viasure/labeling. Kui olete seal, järgige juhiseid, et saada juurdepääs vajalikule keelele. Kui vajate lisateavet, võtke palun ühendust: viasure@certest.es.

FR Pour télécharger l'IFUS dans d'autres langues, veuillez vous rendre sur certest.es/viasure/labeling. Une fois sur place, suivez les instructions pour accéder à la langue dont vous avez besoin. Si vous avez besoin d'informations supplémentaires, contactez: viasure@certest.es.

HR Za preuzimanje IFUS-a s drugih jezika unesite certest.es/viasure/labeling. Kada ste tamo, slijedite upute za pristup jeziku koji vam je potreban. Ako trebate dodatne informacije, obratite se na: viasure@certest.es.

HU Az IFUS más nyelveken történő letöltéséhez kérjük, látogasson el a certest.es/viasure/labeling weboldalra. Ha ott van, kövesse az utasításokat a kívánt nyelv eléréséhez. Ha további információra van szüksége, kérjük, forduljon a következő címre: viasure@certest.es.

IT Per scaricare l'IFUS in altre lingue, vai su certest.es/viasure/labeling. Una volta che sei lì, segui le istruzioni per accedere alla lingua di cui hai bisogno. Se hai bisogno di ulteriori informazioni, contatta: viasure@certest.es.

LT Norédami atsisiųsti IFUS kitomis kalbomis, eikite į certest.es/viasure/labeling. Ten atlikite nurodymus, kad pasiekumėte reikiama kalba. Jei reikia papildomos informacijos, kreipkitės adresu: viasure@certest.es.

LV Lai lejupielādētu IFUS citās valodās, lūdzu, apmeklējet certest.es/viasure/labeling. Pēc tam izpildiet norādījumus, lai piekļūtu vajadzīgajai valodai. Ja nepieciešama papildu informācija, lūdzu, sazinieties ar: viasure@certest.es.

NB For å laste ned IFUS fra andre språk, gå inn på certest.es/viasure/labeling. Når du er der, kan du følge instruksjonene for å få tilgang til det språket du trenger. Hvis du trenger ytterligere informasjon, kan du kontakte: viasure@certest.es.

PT Para baixar o IFUS em outros idiomas europeus, acesse certest.es/viasure/labeling. Uma vez lá, siga as instruções para acessar o idioma que você precisa. Se você precisar de informações adicionais, entre em contato: viasure@certest.es.

RO Pentru a descărca IFUS în alte limbi, vă rugăm să accesați certest.es/viasure/labeling. Accesat site-ul, urmați instrucțiunile pentru a selecta limba necesară. Pentru informații suplimentare, contactați: viasure@certest.es.

SV För att ladda ner IFUS från andra språk, vänligen gå in på certest.es/viasure/labeling. När du är där följer du instruktionerna för att få tillgång till det språk du behöver. Om du behöver ytterligare information, vänligen kontakta: viasure@certest.es.

SK Ak si chcete stiahnuť IFUS v iných jazykoch, prejdite na stránku certest.es/viasure/labeling. Ked' sa tam dostanete, postupujte podľa pokynov a získajte prístup k požadovanému jazyku. Ak potrebujete ďalšie informácie, obráťte sa na: viasure@certest.es.

FI Lataa suomeksi turvallinen käyttöopas osoitteesta certest.es/viasure/labeling. Kun olet siellä, seuraa ohjeita. Jos tarvitset lisätietoja, ota yhteyttä: viasure@certest.es.

Besuchen Sie certest.es/viasure/labeling, wenn Ihre Sprache nicht in der Liste enthalten ist. Wenden Sie sich an viasure@certest.es, wenn Ihre Sprache nicht auf der Website aufgeführt ist.

Hinweis: Der Anwender sollte den Hersteller und die zuständige Behörde des Mitgliedstaates, in dem er als Anwender und/oder Patient niedergelassen ist, über jeden schwerwiegenden Zwischenfall im Zusammenhang mit dem Produkt informieren.

Inhalt

1. Zweckbestimmung	6
2. Zusammenfassung und Erläuterung	6
3. Verfahrensprinzip	7
4. Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien.....	8
5. Vom Benutzer bereitzustellende Reagenzien und Ausrüstung	9
6. Transport-, Lagerungs- und Handhabungsbedingungen.....	9
7. Sicherheitshinweise für Anwender	10
8. Testverfahren	12
8.1. Probenentnahme, -transport und -lagerung.....	12
8.2. Probenvorbereitung und DNA-Extraktion	14
8.3. PCR-Protokoll.....	14
8.3.1. Erstellen eines PCR-Testprogramms für VIASURE HSV-1, HSV-2 & <i>Treponema pallidum</i> Assay for BD MAX™ System	14
8.3.2. Einrichten der BD MAX™ Rack	18
8.3.3. Einrichten des BD MAX™	19
8.3.4. BD MAX™-Ergebnisbericht.....	20
9. Ergebnisinterpretation	20
10. Grenzen des Tests	22
11. Qualitätskontrolle.....	24
12. Analytische Leistungsmerkmale	25
12.1. Analytische Linearität.....	25
12.2. Analytische Sensitivität.....	26
12.2.1. Erfassungsgrenze (LoB).....	26
12.2.2. Nachweisgrenze (LoD)	26
12.3. Messbereich.....	27
12.4. Genauigkeit.....	27
12.4.1. Richtigkeit (Verlässlichkeit)	27
12.4.2. Präzision	28

12.4.3. Genauigkeit.....	31
12.5. Analytische Spezifität und Reaktivität.....	31
12.5.1. Analytische Spezifität	31
12.5.2. Analytische Reaktivität.....	37
12.6. Messtechnische Rückführbarkeit	39
13. Merkmale der klinischen Leistung	39
Literaturverzeichnis	41
Symbole auf IVD-Komponenten und Reagenzien.....	42
Marken.....	42

DEUTSCH

1. Zweckbestimmung

Der VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System ist ein automatisierter qPCR-Test, der für den gleichzeitigen qualitativen Nachweis von DNA aus Herpes-simplex-Virus 1 (HSV-1), Herpes-simplex-Virus 2 (HSV-2) und *Treponema pallidum* (Syphilis) in Abstrichproben von anogenitalen und oralen Hautläsionen bei Patienten mit Verdacht auf eine Infektion mit HSV-1, HSV-2 und *T. pallidum* durch ihren Arzt entwickelt wurde. Dieser Test soll die Diagnose einer Infektion mit den vorgenannten Mikroorganismen in Kombination mit den klinischen Anzeichen und Symptomen und/oder epidemiologischen Risikofaktoren des Patienten erleichtern. Positive Ergebnisse weisen auf das Vorhandensein der Ziel-Nukleinsäuren („Nucleic acids“, NA) hin, schließen jedoch das Vorhandensein anderer, nicht durch den Test nachgewiesener Pathogene nicht aus. Negative Ergebnisse schließen das Vorhandensein von Ziel-NA nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für die Behandlung oder andere Entscheidungen hinsichtlich der Patientenversorgung herangezogen werden. Bei dem Assay wird das BD MAX™ System zur automatisierten DNA-Extraktion und anschließenden qPCR durch Einsatz der mitgelieferten Reagenzien in Kombination mit universellen Reagenzien und Einwegartikeln des BD MAX™ Systems verwendet. Dazu wird DNA aus Proben extrahiert, mittels qPCR amplifiziert und anschließend über spezifische Primer und Sonden mit fluoreszierendem Reportfarbstoff auf HSV-1, HSV-2 und *T. pallidum* nachgewiesen.

Das Produkt ist für die Verwendung durch qualifiziertes und geschultes klinisches Laborpersonal bestimmt, das speziell in den Techniken der Echtzeit-PCR- und *In-vitro*-Diagnoseverfahren (einschließlich der Schulung am Echtzeit-PCR-Gerät (Thermocycler) und am Nukleinsäureextraktionssystem) unterwiesen und geschult wurde.

2. Zusammenfassung und Erläuterung

Die humanen Herpes-simplex-Viren (HSV) Typ 1 und 2 sind zwei der weltweit häufigsten humanen Viren, die in der Regel mit Erkrankungen wie Lippenbläschen, genitalem Herpes, herpetischer Stromakeratitis, Meningitis und Enzephalitis in Verbindung gebracht werden (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). HSV befällt in erster Linie die Haut und die Schleimhäute und verursacht persistierende Infektionen, die aus Ruhephasen (Latenz) und Krankheitsrezidiven (Reaktivierung) bestehen (Cole, 2020; Minaya et al., 2017). Die Übertragung von HSV-1 und HSV-2 erfolgt durch oralen Kontakt, während HSV-2-Infektionen später erfolgen, in der Regel durch sexuelle Übertragung. Die klinischen Manifestationen dieser Viren sind sehr unterschiedlich: asymptomatisch, leicht oder lebensbedrohlich (Cole, 2020; WHO, 2023; Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). Bei den meisten immunkompetenten Personen verursacht HSV eine leichte und selbstlimitierende Erkrankung (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). HSV-Infektionen sind jedoch auch mit einer hohen Morbidität und Mortalität bei bestimmten Personen wie immungeschwächten Patienten verbunden, die an einer wiederkehrenden HSV-Infektion leiden (Cole, 2020; Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). Es wurde festgestellt, dass eine Infektion mit einem

HSV-Typ in der Regel eine Immunität erzeugt, die eine erneute Infektion mit demselben Serotyp, jedoch nicht mit dem anderen (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021) verhindert.

Die Spirochäte *Treponema pallidum* gilt als der Erreger der Geschlechtskrankheit Syphilis sowie von Frambösie, endemischer Syphilis und Pinta, bei denen es sich um mehrstufige Infektionen handelt, die nur auf der Grundlage klinischer, epidemiologischer und geografischer Kriterien unterschieden werden können (Mercuri et al., 2022; Peeling et al., 2023; Radolf et al., 2016; Tudor et al., 2022). *T. p. pertenue* wird mit Frambösie, *T. carateum* mit Pinta und *T. p. endemicum* mit endemischer Syphilis in Verbindung gebracht, doch *T. pallidum subsp. pallidum* ist die einzige Unterart, die mit der Geschlechtskrankheit Syphilis in Verbindung gebracht wird (Mercuri et al., 2022; Tudor et al., 2022).

Syphilis verläuft in mehreren Stadien, die jeweils unterschiedliche Anzeichen und Symptome aufweisen, z. B. Ulzera (Schanker) bei primärer Syphilis und Hautausschläge oder Ulzera bei sekundärer Syphilis (CDC, 2023; Mercuri et al., 2022; Peeling et al., 2023). Aufgrund der Vielzahl der klinischen Manifestationen wird Syphilis auch als „großer Imitator“ bezeichnet (Peeling et al., 2023; Tudor et al., 2022). Diese Erkrankung hat im Laufe der Geschichte verschiedene Risikogruppen betroffen, und obwohl sie 1998 fast ausgerottet war, ist die Inzidenz seit 2000 wieder angestiegen (Mercuri et al., 2022).

Eine Testung zur Unterscheidung zwischen HSV-1 und HSV-2 wird immer empfohlen, da dies sowohl die Prognose als auch das Behandlungsmanagement beeinflusst. Die CDC-Leitlinien empfehlen, die klinische Diagnose mit typenspezifischen virologischen und serologischen Tests zu bestätigen (Cole, 2020). Eine zuverlässige labordiagnostische Methode zum Nachweis einer akuten genitalen HSV-Infektion ist der Nachweis von HSV-1- und HSV-2-DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Cole, 2020). Im Hinblick auf *T. pallidum* werden sowohl der direkte Nachweis als auch serologische Tests für die Labordiagnostik herangezogen, da dieser Erreger nicht kultiviert werden kann (Forrestel et al., 2020). Serologische Tests sind jedoch nicht in der Lage, Syphilis von anderen treponemalen Infektionen zu unterscheiden, da unter den pathogenen Treponemen eine hohe genetische Ähnlichkeit besteht (Forrestel et al., 2020). Nukleinsäure-Amplifikationstechniken wie der PCR-Test ermöglichen den Nachweis bakterieller DNA in klinischen Proben in den frühen Stadien der Erkrankung und bieten aufgrund ihrer hohen Sensitivität eine potenzielle Strategie zur Eindämmung der Syphilis-Epidemie (Peeling et al., 2023).

3. Verfahrensprinzip

VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System wurde für den gleichzeitigen qualitativen Nachweis von DNA aus Herpes-simplex-Virus 1 (HSV-1), Herpes-simplex-Virus 2 (HSV-2) und *Treponema pallidum* (Syphilis) in Abstrichproben von anogenitalen und oralen Hautläsionen entwickelt. Nach der DNA-Isolierung erfolgt die Identifizierung von HSV-1, HSV-2 und *T. pallidum* durch Amplifikation einer konservierten Region des *Glycoprotein-L-UL1*-Gens von HSV-1, des *Glycoprotein-G-US4*-Gens von HSV-2 und des *16S-rRNA*-Gens von *T. pallidum* mithilfe spezifischer Primer und einer fluoreszenzmarkierten Sonde.

VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System nutzt die 5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase. Während der DNA-Amplifikation spaltet dieses Enzym die an die komplementäre DNA-Sequenz gebundene Sonde, wodurch der Quencher-Farbstoff vom Reporter getrennt wird. Diese Reaktion erzeugt eine zur Quantität des Ziel-Templates proportionale Steigerung des Fluoreszenzsignals. Diese Fluoreszenz wird vom System BD MAX™ gemessen.

VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System enthält in jedem Gefäß bereits die für den Echtzeit-PCR-Test erforderlichen Komponenten (spezifische Primer/Sonden, dNTPs, Puffer, Polymerase) in stabilisierter¹ Form sowie eine endogene interne Kontrolle (EIC) (*humane RNase P-Gen*), um die Integrität der Probe zu überwachen, den Extraktionsprozess zu kontrollieren und/oder die Inhibition der Polymeraseaktivität auszuschließen. Humane Housekeeping-Gene sind an den grundlegenden Zellerhaltungsfunktionen beteiligt. Daher wird davon ausgegangen, dass sie in allen kernhaltigen menschlichen Zellen vorliegen und relativ konstante Expressionsniveaus zeigen.

Zielsequenz	Kanal	Gen
HSV-1	475/520	<i>Glycoprotein-L-UL1-Gen</i>
HSV-2	530/565	<i>Glycoprotein-G-US4-Gen</i>
<i>T. pallidum</i>	630/665	<i>16S-rRNA-Gen</i>
Endogene interne Kontrolle (EIC)	585/630	<i>RNAse P</i>

Tabelle 1. Zielsequenz, Kanal und Gene.

4. Im Lieferumfang enthaltene Reagenzien

VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System enthält die in Tabelle 2 aufgeführten Materialien und Reagenzien:

Reagenz/Material	Beschreibung	Konzentrationsbereich	Code	Menge
<i>HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum</i> reaction tube	Lyoprotektoren und Stabilisatoren	± 6 g/100 ml*	1E-Folie	2 Beutel mit je 12 transparenten Röhrchen
	Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	± 1 mM*		
	Primer und Sonden	0,2–1 nMol/µl*		
	Enzyme	10–100 U/Reaktion*		
Rehydration Buffer tube	Kochsalzlösungsgemisch	± 13 mM	11-Folie	1 Beutel mit je 24 transparenten Röhrchen
	Puffer (TRIS, pH)	± 67 mM		

Tabelle 2. Reagenzien und Materialien im VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System mit Kat.-Nr. 444222.

* Bei Komponenten in stabilisierter Form bezieht sich der Konzentrationsbereich auf Konzentrationen nach der Rehydrierung.

¹ Bitte beachten Sie, dass die Begriffe „stabilisiert“ und „lyophilisiert“ im gesamten Dokument nicht unterscheidbar und als Synonyme verwendet werden.

5. Vom Benutzer bereitzustellende Reagenzien und Ausrüstung

Nachfolgend sind die erforderlichen, jedoch nicht im Lieferumfang des VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System enthaltenen Materialien aufgeführt.

- Echtzeit-PCR-Gerät: BD MAX™ System (Ref.-Nr.: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref.-Nr.: 442827 oder 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Kartuschen) (Ref.-Nr.: 437519).
- Vortexmischer
- Mikropipetten (präzise zwischen 2 und 1000 µl).
- Nuklease-freies Wasser
- Filterspitzen
- Puderfreie Einweghandschuhe

Optional:

- Externe Kontrollmaterialien können im Rahmen des Qualitätskontrollverfahrens zur Beurteilung der Assay-Leistung eingesetzt werden. Handelsübliches Kontrollmaterial und/oder Proben, die zuvor als positiv oder negativ charakterisiert worden sind, können als externe Positivkontrolle (EPC) bzw. externe Negativkontrolle (ENC) verwendet werden. Die Auswahl und Validierung der EPC und ENC muss in Übereinstimmung mit den geltenden lokalen, staatlichen und/oder nationalen Vorschriften sowie den standardmäßigen Qualitätskontrollverfahren des Labors erfolgen. Darüber hinaus hat der Anwender bei der Verwendung von handelsüblichem Kontrollmaterial die entsprechenden Gebrauchsanweisungen zu befolgen.

6. Transport-, Lagerungs- und Handhabungsbedingungen

- Die Kits können bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfalldatum bei 2 °C bis 30 °C transportiert und gelagert werden.
- Erschütterungen beim Transport vermeiden, um das Auslaufen von Flüssigkeit zu verhindern.
- Nach dem Öffnen der Aluminiumbeutel können die darin enthaltenen Reaktionsgefäß bis zu 28 Tage bei 2 bis 30 °C verwendet werden. Das Fläschchen lichtgeschützt aufbewahren.

In der folgenden Tabelle sind die Bedingungen für Transport, Lagerung und Handhabung des Kits sowie für jede einzelne Komponente zusammengefasst:

Komponente	Transportbedingungen	Lagerungsbedingungen	Handhabungsbedingungen
Komplettes VIASURE HSV-1, HSV-2 & <i>Treponema pallidum</i> Assay for BD MAX™ System		Vor dem Gebrauch: 2 °C bis 30 °C über die auf dem Etikett des Kits angegebene Haltbarkeitsdauer.	* Siehe Handhabungsbedingungen der einzelnen Komponenten.
HSV-1, HSV-2 & <i>Treponema pallidum</i> reaction tube (1E-Folie)	2 °C bis 30 °C über die auf dem Etikett des Kits angegebene Haltbarkeitsdauer.	Vor dem Gebrauch: 2 °C bis 30 °C über die auf dem Etikett des Kits angegebene Haltbarkeitsdauer. Nach Öffnen des Beutels mit dem Trockenmittel: 2 bis 30 °C für bis zu 28 Tage.	Raumtemperatur.
Rehydration Buffer tube		Vor dem Gebrauch: 2 °C bis 30 °C über die auf dem Etikett des Kits angegebene Haltbarkeitsdauer. Nach Öffnen des Beutels mit dem Trockenmittel: 2 bis 30 °C für bis zu 28 Tage.	Raumtemperatur.

Tabelle 3. Zusammenfassung der Bedingungen für Transport, Lagerung und Verwendung des VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System und der einzelnen Komponenten.

7. Sicherheitshinweise für Anwender

- Das Produkt ist für die Verwendung durch qualifiziertes und geschultes klinisches Laborpersonal bestimmt, das speziell in den Techniken der Echtzeit-PCR, der Humangenetik und *In-vitro*-Diagnoseverfahren unterwiesen und geschult wurde.
- In-vitro*-Diagnostikum.
- Die Gebrauchsanweisung für das VIASURE Produkt und das BD MAX™ System Anwenderhandbuch sind vor der Verwendung des VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System aufmerksam durchzulesen. Führen Sie den Test erst dann durch, wenn Sie sich mit den darin angegebenen Informationen über Verfahren, Sicherheitsvorkehrungen und Einschränkungen vertraut gemacht haben.
- Keine abgelaufenen Reagenzien und/oder Materialien verwenden.
- Das Kit nicht verwenden, wenn das Etikett, das die Außenverpackung versiegelt, aufgerissen ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn der Schutzbehälter bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt ist.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Schutzbeutel bei Ankunft bereits geöffnet oder beschädigt sind.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn sich in den Reagenzbeuteln kein Trockenmittel befindet oder dieses beschädigt ist.
- Trockenmittel nicht aus Reagenzbeuteln entfernen.
- Reagenzien nicht verwenden, wenn die Folie gerissen oder beschädigt ist.
- Reagenzien unterschiedlicher Beutel und/oder Kits und/oder Chargen nicht vermischen.
- Schutzbeutel von Reagenzien nach jedem Gebrauch sofort mit dem Zippverschluss schließen, um den Mastermix vor Sonneneinstrahlung zu schützen. Vor dem Verschließen überschüssige Luft aus den Beuteln entfernen.
- Reagenzien vor Feuchtigkeit schützen. Sollten diese für längere Zeit Feuchtigkeit ausgesetzt sein, wirkt sich dies nachteilig auf die Produktleistung aus.

- Zur Vermeidung von Beschädigungen des Etiketts das Produkt nicht in der Nähe von Lösemitteln verwenden.
- Zeigt das Reaktionsgemisch in stabilisierter Form, das sich in der Regel am Boden des Röhrchens befindet, ein anderes Erscheinungsbild als üblich (keine konische Form, Inhomogenität, kleineres/größeres Volumen und/oder eine andere Färbung als weißlich), so hat dies keinen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Tests.
- Sicherstellen, dass das Reaktionsgefäß und das Rehydrationspuffer-Röhrchen bei der Einrichtung des BD MAX™ Racks sicher einrasten.
- In Fällen, in denen andere PCR-Tests im selben allgemeinen Laborbereich durchgeführt werden, ist Sorge dafür zu tragen, dass das VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, BD MAX™ ExK™ TNA-3 Extraktions-Kit, sonstige zusätzlich für den Test erforderliche Reagenzien und das BD MAX™ System nicht kontaminiert werden. Eine Kontamination der Reagenzien durch Mikroorganismen sowie Ribonuklease (RNase) und Desoxyribonuklease (DNase) ist unter allen Umständen zu vermeiden. Die Verwendung von RNase-/DNase-freien aerosolresistenten Einweg-Pipettenspitzen oder Direktverdrängungspipettenspitzen wird empfohlen. Verwenden Sie für jede Probe eine neue Spitze. Vor dem Umgang mit Reagenzien und Kartuschen (BD MAX™ PCR Cartridge) müssen die Handschuhe gewechselt werden.
- Um die Kontamination der Umgebung durch Amplikons zu vermeiden, zerbrechen Sie die BD MAX™ PCR Cartridge Kartusche nicht nach Gebrauch. Die Versiegelung der BD MAX™ PCR Cartridge Kartusche ist darauf ausgelegt, Kontaminationen zu verhindern.
- Einen Arbeitsfluss in eine Richtung einrichten. Der Arbeitsfluss sollte im „Extraction Area“ (Extraktionsbereich) beginnen und zum „Amplification and Detection Area“ (Amplifikations- und Detektionsbereich) übergehen. Bringen Sie Proben, Ausrüstungsgegenstände oder Reagenzien nicht in einen Bereich zurück, in dem ein vorheriger Schritt durchgeführt wurde.
- Die Grundsätze der guten Laborpraxis befolgen. Schutzkleidung, Einweghandschuhe, Schutzbrillen und Schutzmasken verwenden. Im Arbeitsbereich nicht essen, trinken, rauchen und keine Kosmetikprodukte anwenden. Nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- Proben sowie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit den Proben in Berührung gekommen sind, immer als potenziell infektiös und/oder biologisch gefährlich betrachten und entsprechend den nationalen Sicherheitsrichtlinien behandeln. Während der Entnahme, des Transports, der Lagerung, Handhabung und Entsorgung von Proben die erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
- Proben und Reagenzien müssen in einer biologischen Sicherheitswerkbank gehandhabt werden. Persönliche Schutzausrüstung (PSA) verwenden, die den aktuellen Richtlinien für den Umgang mit potenziell infektiösen Proben entspricht. Abfall in Übereinstimmung mit den örtlichen und Landesvorschriften entsorgen.
- Eine regelmäßige Dekontaminierung von häufig genutzten Ausrüstungsgegenständen und Flächen, insbesondere Mikropipetten und Arbeitsoberflächen, wird empfohlen.

- Gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (REACH) sind für die VIASURE Assays for BD MAX™ System aufgrund ihrer Einstufung als nicht gesundheits- und umweltgefährdend keine Sicherheitsdatenblätter erforderlich, da sie keine Substanzen und/oder Gemische enthalten, die die in der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 (CLP) festgelegten Kriterien für die Gefahreneinstufung erfüllen oder deren Konzentration den in der genannten Verordnung festgelegten Wert für die Deklaration überschreitet. Eine Erklärung, der zufolge kein Sicherheitsdatenblatt erforderlich ist, kann bei Certest Biotec S.L. angefordert werden.
- Vergewissern Sie sich, dass die Definition des PCR-Testprogramms auf dem BD MAX™ System entsprechend den Anweisungen im Abschnitt „PCR-Protokoll“ (Probenextraktionsparameter, benutzerdefinierte Barcodes, PCR-Einstellungen usw.) erfolgt.
- Weitere Warn-, Sicherheits- und Verfahrenshinweise finden Sie im Benutzerhandbuch zum System BD MAX™.
- Das Analysezertifikat ist diesem Gerät nicht beigefügt, kann bei Bedarf jedoch über die Website von Certest Biotec S.L. (www.certest.es) heruntergeladen werden.

8. Testverfahren

8.1. Probenentnahme, -transport und -lagerung

VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System wurde mit anogenitalen und oralen Abstrichproben von Hautläsionen getestet, die mit dem Copan ESwab® (Copan's Liquid Amies Elution Swab) entnommen wurden (im Folgenden Proben von natürlichen Hautläsionen). Andere Arten von Proben müssen vom Benutzer validiert werden.

Die Entnahme, die Lagerung und der Transport von Proben sollte unter den vom Benutzer validierten Bedingungen erfolgen. Klinische Proben sind grundsätzlich in geeigneter Weise in sauberen Behältern mit oder ohne Transportmedium (je nach Probentyp) aufzufangen und zu kennzeichnen. Nach der Gewinnung sollten die Proben in einem Beutel für biogefährliche Materialien gegeben und so schnell wie möglich weitertransportiert und verarbeitet werden, um eine gute Qualität des Tests zu gewährleisten. Die Proben sollten gemäß den lokalen und nationalen Bestimmungen für den Transport von pathogenem Material nicht länger als 48 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 2 ± 2 °C transportiert werden. Für einen Langzeittransport empfehlen wir eine Temperatur von -20 °C oder darunter². Proben, die für molekulare Tests eingereicht wurden, müssen unter kontrollierten Bedingungen gelagert werden, damit die Nukleinsäuren während der Lagerung nicht abgebaut werden. Es wird empfohlen, frische Proben für den Test zu

² IDSA-Leitlinie (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94))

verwenden. Sollte dies nicht möglich sein oder im Fall einer retrospektiven Studie sind die Proben vorzugsweise bei -70 oder -80 °C oder alternativ bei -20 °C aufzubewahren³.

Die klinischen Proben müssen gemäß den entsprechenden Laborrichtlinien und/oder Verfahrensrichtlinien für Labore entnommen, transportiert, und gelagert werden. Beispiele finden sich in der IDSA-Leitlinie (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94) oder Sánchez-Romero, M. I., García-Lechuz Moya, J. M., González López, J. J. & Orta Mira, N. Collection, transport and general processing of clinical specimens in Microbiology laboratory (Entnahme, Transport und allgemeine Verarbeitung klinischer Proben im mikrobiologischen Labor). *Enfermedades Infec. y Microbiol. Clin.* (Englische Ausgabe) 37, 127–134 (2019).

Bitte beachten: Die oben genannten Entnahme-, Transport- und Lagerungsbedingungen basieren auf den Empfehlungen für Proben des Urogenitaltrakts, die zum Nachweis von Nukleinsäuren bestimmt und in den vorgenannten einschlägigen Leitfäden aufgeführt sind. Darüber hinaus empfehlen wir, die Laborrichtlinien und/oder das entsprechende Handbuch zur Handhabung der Proben im Labor für den ordnungsgemäßen Transport und die Konservierung von Proben zu befolgen.

Eine interne Stabilitätsstudie mit VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System wurde unter Verwendung einer natürlichen Hautläsion als Negativmatrix durchgeführt, die mit dem Humanen Herpesvirus 1, Stamm KOS (ATCC® VR-1493 Ref. FR-310 (IRR)), Herpes-simplex-Virus Typ 2, Stamm MS (Ref. 0810006CF, Zeptometrix) und *Treponema pallidum*, Stamm SS14 (Washington University) bei 3xLoD-Konzentration angereichert wurde. Die Stabilität wurde anhand von drei verschiedenen Tests analysiert: verschachtelte Stabilität der Primärproben mit Stabilität im SBT bei 2 ± 2 °C und 25 ± 2 °C, Stabilität der Primärproben bei -20 ± 2 °C und Stabilität bei Gefrier- (-80 °C) und Auftauzyklen (25 °C). Die Ergebnisse zeigten eine gute Leistung der unter allen Testbedingungen aufbewahrten Proben. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass natürliche Proben von Hautläsionen in Bezug auf die Stabilität der Primärproben nach 48 Stunden bei 2 ± 2 °C und 25 ± 2 °C stabil sind. In Bezug auf die Stabilität im SBT sind die Proben nach 7 Tagen im SBT bei 2 ± 2 °C und 25 ± 2 °C stabil (nachdem sie zuvor bis zu 48 Stunden bei 2 ± 2 °C und 25 ± 2 °C gelagert wurden, bevor sie dem SBT hinzugefügt wurden). Außerdem sind die Proben nach 6 Monaten Lagerung bei -20 ± 2 °C und nach mindestens 5 Gefrier-Auftau-Zyklen stabil.

³ Sánchez-Romero, M. I., García-Lechuz Moya, J. M., González López, J. J. & Orta Mira, N. Collection, transport and general processing of clinical specimens in Microbiology laboratory. *Enfermedades Infec. y Microbiol. Clin.* (Englische Ausgabe) 37, 127–134 (2019).

8.2. Probenvorbereitung und DNA-Extraktion

Die Probenvorbereitung gemäß den in der Gebrauchsanweisung des verwendeten Extraktions-Kits BD MAX™ ExK™ TNA-3 aufgeführten Empfehlungen durchführen.

1. Pipettieren Sie 500 µl der Probe in ein BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube und verschließen Sie das Röhrchen mit einem Septumverschluss. Sorgen Sie für eine vollständige Vermischung, indem Sie die Probe bei hoher Geschwindigkeit 1 Minute vortexen. Führen Sie die Bearbeitung am BD MAX™ System Operation fort.

Hinweis: Achten Sie darauf, dass das Vortexen einige Minuten vor dem Start des Durchlaufs stattfindet. Wird dasselbe BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube für die Wiederholung eines Tests verwendet, sollte das Röhrchen kurz vor Beginn des Tests manuell geschüttelt werden, um eine ausreichende Homogenisierung der Probe sicherzustellen.

Beachten Sie, dass anwendungsspezifische Vorbereitungsmaßnahmen für die Extraktion entwickelt und vom Benutzer validiert werden sollten und dass andere Proben möglicherweise eine Vorbehandlung erfordern.

8.3. PCR-Protokoll

Hinweis: Ausführliche Anweisungen entnehmen Sie bitte dem Benutzerhandbuch des BD MAX™ Systems.

8.3.1. Erstellen eines PCR-Testprogramms für VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System

Hinweis: Wenn Sie bereits den Test für den VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System angelegt haben, können Sie Schritt 8.3.1 auslassen und direkt mit Schritt 8.3.2 fortfahren.

- 1) Wählen Sie am Bildschirm „Run“ (Durchlauf) des BD MAX™ System die Registerkarte „Test Editor“ (Test-Assistent).
- 2) Klicken Sie auf die Schaltfläche „Create“ (Erstellen).

Im Tab „Basic Information“ (Grundlegende Informationen):

- 3) Geben Sie im Feld „Test Name“ (Testbezeichnung) einen Namen für Ihren Test ein: z. B. VIASURE HHT.

Hinweis: Die Testbezeichnung muss eindeutig sein und darf eine Länge von 20 Zeichen nicht überschreiten.

- 4) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Extraction Type“ (Extraktionstyp) die Option „ExK TNA-3“.

- 5) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Master Mix Format“ (Format Master Mix) die Option „Type 5: Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer“ (Typ 5: Konzentrierter lyophilisierter MM mit Rehydrationspuffer).
- 6) Wählen Sie im Feld „Sample Extraction Parameters“ (Probenextraktionsparameter) die Option „User Defined“ (Benutzerdefiniert) und stellen Sie die folgenden Parameterwerte ein (Tabelle 4).

<i>Sample Extraction Parameters</i> (Probenextraktionsparameter)	<i>Value (units)</i> (Wert (Einheiten))
<i>Lysis Heat Time</i> (Lyse-Erhitzungsdauer)	15 (Min.)
<i>Lysis Temperature</i> (Lyse-Temperatur)	55 (°C)
<i>Sample Tip Height</i> (Höhe der Probenpipettenspitze)	1600 (Schritte)
<i>Sample Volume</i> (Probenvolumen)	475 (µl)
<i>Wash Volume</i> (Spülvolumen)	500 (µl)
<i>Neutralization Volume</i> (Neutralisierungsvolumen)	n. a.
<i>DNase Heat Time</i> (DNase-Erhitzungsdauer)	n. a.

Tabelle 4. Parameter der mit dem BD MAX™ ExK™ TNA-3 durchgeführten Probenextraktion.

- 7) Wählen Sie im Feld „Ct Calculation“ (Ct-Berechnung) die Option „Call Ct at Threshold Crossing“ (Ct bei Grenzwertüberschreitung abrufen) (Voreinstellung) aus.
- 8) Wenn Sie die Software-Version 5.00 oder höher verwenden und barcodierte Folien-Snap-in-Röhrchen einsetzen, wählen Sie im Feld „Custom Barcodes“ (Kundendefinierte Barcodes) die folgende Konfiguration:
 - a. Snap-In 2 Barcode (Barcode für Snap-In 2): 1E (betreffend *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* reaction tube).
 - b. Snap-In 3 Barcode (Barcode für Snap-In 3): 11 (für das Rehydration Buffer Tube).

Im Register „PCR Settings“ (PCR-Einstellungen):

- 9) Geben Sie im Feld „PCR Settings“ (PCR-Einstellungen) die folgenden in Tabelle 5 beschriebenen Parameter ein: „Alias“ (bis zu sieben alphanumerische Zeichen), „PCR Gain“ (PCR-Verstärkung), „Threshold“ (Schwellenwert), „Ct Min“ und „Ct Max“.

<i>Channel</i> (Kanal)	<i>Alias (Alias)</i>	<i>PCR Gain</i> (PCR-Verstärkung)	<i>Threshold</i> (Schwellenwert)	<i>Ct Min</i> (Ct min.)	<i>Ct Max</i> (Ct max.)
475/520 (FAM)	HSV1	40	200	0	40
530/565 (HEX)	HSV2	60	200	0	40
585/630 (ROX)	EIC	40	200	0	40
630/665 (Cy5)	TRE	60	200	0	40
680/715 (Cy5.5)	–	0	0	0	0

Tabelle 5. PCR-Einstellungen.

Hinweis: Es empfiehlt sich, die oben für die einzelnen Kanäle aufgelisteten Mindest-Schwellenwerte als Ausgangspunkt einzustellen. Die endgültigen Einstellungen müssen jedoch vom Endanwender bei der Ergebnisinterpretation festgelegt werden, um sicherzugehen, dass die Schwellenwerte in der exponentiellen Phase der Fluoreszenzkurven und über einem etwaigen Hintergrundsignal liegen. Der Schwellenwert für verschiedene Geräte kann aufgrund verschiedener Signalintensitäten variieren.

- 10) Geben Sie im Feld „Color compensation“ (Farbkompensation) die folgenden (in Tabelle 6 beschriebenen) Parameter ein:

		False Receiving Channel (Falsch-empfänger Kanal)					
		Channel (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Exzitationskanal)	475/520	–	4	0	0	0	
	530/565	0	–	0	0	0	
	585/630	0	0	–	4	0	
	630/665	0	0	0	–	0	
	680/715	0	0	0	0	–	

Tabelle 6. Parameter für „Color compensation“ (Farbkompensation).

Im Register „Melt Settings“ (Schmelzkurve-Einstellungen) sind keine Aktionen erforderlich, da es für dieses Produkt nicht relevant ist.

Im Register „Test Steps“ (Testschritte):

- 11) Geben Sie die Schritt-Bezeichnung (bis zu zwanzig Zeichen) ein und stellen Sie die folgenden Parameter ein, um die einzelnen Schritte des PCR-Protokolls zu definieren: „Profile Type“ (Profiltyp), „Cycles“ (Zyklen), „Time“ (Dauer) und „Temperature“ (Temperatur) und aktivieren Sie das Feld „Detect“ (Detektion), um den Detektionsschritt zu definieren (Tabelle 7). Klicken Sie auf die Schaltfläche „Add“ (Hinzufügen), um einen neuen Schritt hinzuzufügen, und wiederholen Sie dies, bis alle erforderlichen Schritte definiert sind.

Hinweis: Das Feld „Type“ (Typ) muss leer sein.

Step (Schritt)	Step name (Schrittbezeichnung)	Profile Type (Profiltyp)	Cycles (Zyklen)	Time (s) (Zeit (s))	Temperature (Temperatur)	Detect (Detektion)
Initial denaturation (Initiale Denaturierung)	IN-denaturation	Hold	1	120	98 °C	–
Denaturierung und Hybridisierung/Extension (Datenerfassung)	Annealing/Extension	2- Temperature	45	10	95 °C	–
				41	63 °C	✓

Tabelle 7. PCR-Protokoll.

In der Registerkarte „Result Logic“ (Ergebnislogik):

- 12) Geben Sie im Feld „Target“ (Ziel) einen Namen für Ihr Ziel ein: z. B. HSV1 (maximal sieben alphanumerische Zeichen). Wiederholen Sie die Schritte 12–15 für jedes Ziel (d. h. HSV2 oder TRE) anhand der Tabellen, die für das zu definierende Ziel spezifisch sind.
- 13) Klicken Sie auf das Kontrollkästchen „Analyze“ (Analysieren), um die gewünschten Wellenlängen (PCR-Kanäle) in die Zielergebnisanalyse einzubeziehen (Tabellen 8-10).

Wavelength (Wellenlänge)	Alias (Alias)	Type (Typ)	Analyze (Analyse)
475/520	HSV1	PCR	✓
585/630	EIC	PCR	✓

Tabelle 8. Auswahl der PCR-Kanäle in der Registerkarte „Result logic“ (Ergebnislogik) zum HSV1-Ziel (Herpes-simplex-Virus 1).

Wavelength (Wellenlänge)	Alias (Alias)	Type (Typ)	Analyze (Analyse)
530/565	HSV2	PCR	✓
585/630	EIC	PCR	✓

Tabelle 9. Auswahl der PCR-Kanäle in der Registerkarte „Result logic“ (Ergebnislogik) zum HSV2-Ziel (Herpes-simplex-Virus 2).

Wavelength (Wellenlänge)	Alias (Alias)	Type (Typ)	Analyze (Analyse)
585/630	EIC	PCR	✓
630/665	TRE	PCR	✓

Tabelle 10. Auswahl der PCR-Kanäle in der Registerkarte „Result logic“ (Ergebnislogik) zum TRE-Ziel (*Treponema pallidum*).

14) Klicken Sie auf die Schaltfläche „Edit Logic“ (Logik bearbeiten).

15) Im Fenster „Edit Logic“ (Logik bearbeiten) sind alle Kombinationen von Ergebnistypen aufgelistet.

Wählen Sie für jede Zeile in der Dropdown-Liste „Result“ (Ergebnis) das Ergebnis aus, das auftritt, wenn die Bedingungen in dieser Zeile erfüllt sind, und orientieren Sie sich dabei an den Tabellen 11-13.

Result (Ergebnis)	HSV1 (475/ 520)	EIC (585/ 630)
POS	Valid (Gültig)	Valid (Gültig)
UNR	Valid (Gültig)	Invalid (Ungültig)
NEG	Invalid (Ungültig)	Valid (Gültig)
UNR	Invalid (Ungültig)	Invalid (Ungültig)

Tabelle 11. Liste der Kombinationen von Ergebnistypen und Ergebnislogik für das HSV1-Ziel (Herpes-simplex-Virus 1). Verfügbare Ergebnisse sind POS (positiv), NEG (negativ) und UNR (unklar).

Result (Ergebnis)	HSV2 (530/ 565)	EIC (585/ 630)
POS	Valid (Gültig)	Valid (Gültig)
UNR	Valid (Gültig)	Invalid (Ungültig)
NEG	Invalid (Ungültig)	Valid (Gültig)
UNR	Invalid (Ungültig)	Invalid (Ungültig)

Tabelle 12. Liste der Kombinationen von Ergebnistypen und Ergebnislogik für das HSV2-Ziel (Herpes-simplex-Virus 2). Verfügbare Ergebnisse sind POS (positiv), NEG (negativ) und UNR (unklar).

Result (Ergebnis)	TRE (630/ 665)	EIC (585/ 630)
POS	Valid (Gültig)	Valid (Gültig)
UNR	Valid (Gültig)	Invalid (Ungültig)
NEG	Invalid (Ungültig)	Valid (Gültig)
UNR	Invalid (Ungültig)	Invalid (Ungültig)

Tabelle 13. Liste der Kombinationen von Ergebnistypen und Ergebnislogik für das TRE-Ziel (*Treponema pallidum*). Verfügbare Ergebnisse sind POS (positiv), NEG (negativ) und UNR (unklar).

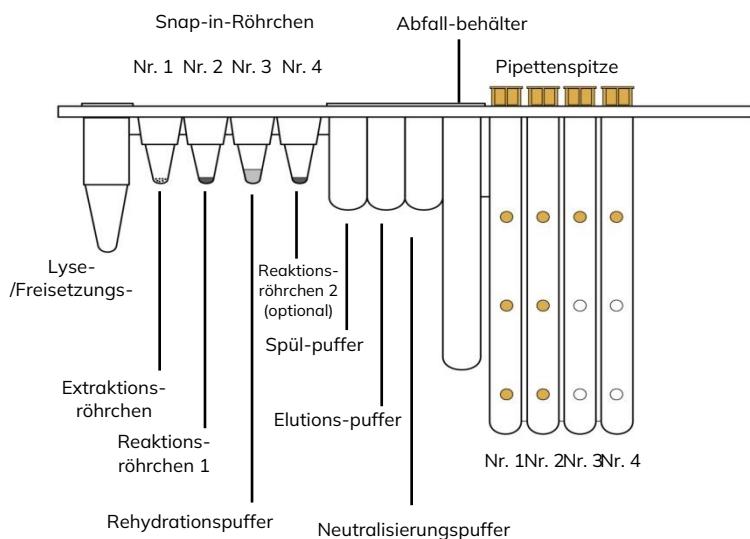
Hinweis: Gemäß dem zuvor definierten Wert Ct Max (Tabelle 5) gilt der Ergebnistyp für die Kanäle HSV1 (475/520), HSV2 (530/565), EIC (585/630) und TRE (630/665) als „Valid“ (gültig), wenn der erhaltene Ct-Wert ≤ 40 beträgt, und als „Invalid“ (ungültig), wenn der erhaltene Ct-Wert > 40 ist.

16) Klicken Sie auf die Schaltfläche „Save“ (Speichern), um den Test zu speichern.

8.3.2. Einrichten der BD MAX™ Rack

- 1) Nehmen Sie für jede zu testende Probe einen Unitized Reagent Strip (Einzel-Reagenzstreifen) aus dem BD MAX™ ExK™ TNA-3 Kit. Klopfen Sie jeden Streifen leicht auf eine harte Oberfläche, damit sich alle Flüssigkeiten am Boden der Röhrchen befinden, und laden Sie sie in die Probenracks des BD MAX™ Systems.
- 2) Nehmen Sie die benötigte Anzahl an BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (Extraktionsröhrchen, B4, weiße Folie) aus den Schutzbeuteln. Lassen Sie das bzw. die Extraction Tube(s) – weiße Folie – in ihre entsprechenden Positionen im TNA-Streifen einrasten (Einrastposition 1, weiße Farbkodierung am Rack; siehe Abbildung 1). Entfernen Sie überschüssige Luft, und verschließen Sie den Beutel mit dem Zippverschluss.
- 3) Bestimmen und separieren Sie die erforderliche Anzahl an *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* reaction tubes (1E-Folie) und lassen Sie sie in ihre entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 2, grüne Farbkodierung am Rack. siehe Abbildung 1).
 - a. Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie die Aluminiumbeutel mit dem Zippverschluss.
 - b. Stellen Sie zur Durchführung einer korrekten Rehydration bitte sicher, dass sich das lyophilisierte Produkt am Boden des Gefäßes befindet und nicht im oberen Bereich des Gefäßes oder an der Siegelfolie anhaftet. Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, damit sich das gesamte Produkt am Boden des Röhrchens befindet.
- 4) Entnehmen Sie die benötigte Anzahl an Rehydration Buffer tubes (11-Folie), und lassen Sie sie in ihre entsprechenden Positionen im Streifen einrasten (Einrastposition 3, ohne Farbkodierung am Rack; siehe Abbildung 1).
 - a. Entfernen Sie überschüssige Luft und verschließen Sie den Beutel mit dem Zippverschluss.
 - b. Achten Sie für eine korrekte Überführung bitte darauf, dass sich die Flüssigkeit am Boden des Gefäßes befindet und nicht im oberen Bereich des Gefäßes oder an der Siegelfolie anhaftet. Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, damit sich der gesamte Puffer am Boden des Röhrchens befindet.

Abbildung 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) aus dem BD MAX™ ExK™ TNA-3 Kit.



8.3.3. Einrichten des BD MAX™

- 1) Wählen Sie im Bildschirm „Run“ (Durchlauf) des Systems BD MAX™ (Software v4.50A oder höher) die Registerkarte „Worklist“ (Arbeitsliste).
- 2) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Test“ den gewünschten Test, d. h. VIASURE HHT (falls nicht bereits erstellt, siehe Abschnitt 8.3.1).
- 3) Wählen Sie im Dropdown-Menü „Kit Lot Number“ (Kit-Losnummer) die entsprechende Losnummer zum Kit aus (diese ist der Außenverpackung des verwendeten Extraktions-Kits zu entnehmen) (optional).

Hinweis: Losnummern müssen im Bildschirm „Inventory“ (Bestand) definiert werden, bevor sie an dieser Stelle ausgewählt werden können.
- 4) Geben Sie die Identifikationsnummer des Sample-Buffer-Tube-Probenpufferröhrchen im Feld „Sample tube“ (Probenröhrchen) durch Scannen des Barcodes mit dem Scanner oder durch manuelle Eingabe ein.
- 5) Füllen Sie das Feld „Patient ID“ (Patienten-ID) und/oder „Accession“ (Zugangsnummer) aus, und klicken Sie auf die Tabulator- oder die Eingabetaste. Wiederholen Sie das beschriebene Verfahren, bis alle Sample-Buffer-Tube-(Probenpufferröhrchen-)Strichcodes erfasst sind. Vergewissern Sie sich, dass die „specimen/patient ID“ (Proben/Patienten-ID) und die „Sample Buffer Tubes“ (Probenpufferröhrchen) genau zugehörig sind.
- 6) Setzen Sie das/die vorbereitete(n) Sample-Buffer-Tube-Probenpufferröhrchen in das/die BD MAX™-Rack(s) ein.
- 7) Laden Sie das/die Rack(s) in das BD MAX™ System (Rack A befindet sich auf der linken Seite des BD MAX™ Systems und Rack B auf der rechten Seite).
- 8) Setzen Sie die erforderliche Anzahl an BD MAX™ PCR Cartridge(s) in das BD MAX™ System ein.

- 9) Schließen Sie die Tür des BD MAX™ Systems.
- 10) Klicken Sie auf „Start“ (Starten), um den Vorgang zu starten.

8.3.4. BD MAX™-Ergebnisbericht

- 1) Klicken Sie in der Menüleiste auf die Schaltfläche „Results“ (Ergebnisse).
- 2) Doppelklicken Sie auf Ihren Durchlauf in der Liste oder betätigen Sie die Schaltfläche „View“ (Ansicht).
- 3) Die Schaltflächen „Print“ (Drucken) und „Export“ (Exportieren) am unteren Rand des Bildschirms werden aktiviert.

Zum Drucken der Ergebnisse:

1. Klicken Sie auf „Print“ (Drucken).
2. Wählen Sie in der „Print“ Druckvorschau des Durchlaufberichts die Optionen: „Run Details“ (Durchlaufdetails), „Test Details“ (Testdetails) und „Plots“ (Graphiken).
3. Klicken Sie auf „Print“ (Drucken), um den Bericht zu drucken, oder klicken Sie auf „Export“ (Exportieren), um eine PDF-Datei des Berichts auf einen USB-Stick zu exportieren.

Zum Exportieren der Ergebnisse:

1. Klicken Sie auf die Schaltfläche „Export“ (Exportieren), um den Bericht (PDF- und CSV-Datei) auf einen USB-Stick zu übertragen.
2. Nach Abschluss des Exports wird im Fenster „Results Export“ (Ergebnisse Export) ein Symbol für Erfolg/Misserfolg angezeigt.

9. Ergebnisinterpretation

Nähere Angaben zur Auswertung von Daten erhalten Sie im Benutzerhandbuch des BD MAX™ Systems.

Die Datenanalyse durch die BD MAX™ Software erfolgt entsprechend den Herstelleranweisungen. Die BD MAX™ Software gibt die Ct-Werte und Amplifikationskurven für jeden Detektionskanal aller getesteten Proben auf folgende Weise an:

- Ein Ct-Wert von 0 gibt an, dass kein Ct-Wert mit dem spezifizierten Schwellenwert von der Software berechnet wurde (siehe Tabelle 5). Eine Amplifikationskurve einer Probe mit einem Ct-Wert von „0“ muss manuell geprüft werden.
- Ein Ct-Wert von -1 zeigt an, dass kein Amplifikationsprozess stattgefunden hat, dass kein Ct-Wert von der Software berechnet worden ist oder dass der berechnete Ct-Wert unter dem festgelegten Schwellenwert oder über dem festgelegten Ct-Max-Wert (Cut-off) liegt.

- Jeder andere Ct-Wert ist in Übereinstimmung mit der Amplifikationskurve und entsprechend der definierten Ergebnislogik in Einklang mit den Leitlinien für die Probenauswertung in Tabelle 14 auszuwerten.

Überprüfen Sie das Signal der endogenen internen Kontrolle (EIC), um die korrekte Funktionsweise der Amplifikationsmischung sicherzustellen. Überprüfen Sie zusätzlich, dass keine Störungsmeldung zum System BD MAX™ vorliegt.

Die Ergebnisse sind anhand der folgenden Tabelle abzulesen und auszuwerten:

HSV-1 (Name des Ziels: HSV1)	HSV-2 (Name des Ziels: HSV2)	<i>T. pallidum</i> (Name des Ziels: TRE)	Interpretation bei Patienteneinzelproben
POS	POS	POS	HSV-1-, HSV-2- und <i>Treponema pallidum</i> -DNA nachgewiesen.
POS	POS	NEG	HSV-1- und HSV-2-DNA nachgewiesen. <i>Treponema pallidum</i> -DNA nicht nachgewiesen.
POS	NEG	POS	HSV-1- und <i>Treponema pallidum</i> -DNA nachgewiesen. HSV-2-DNA nicht nachgewiesen.
NEG	POS	POS	HSV-2- und <i>Treponema pallidum</i> -DNA nachgewiesen. HSV-1-DNA nicht nachgewiesen.
POS	NEG	NEG	HSV-1-DNA nachgewiesen. HSV-2- und <i>Treponema pallidum</i> -DNA nicht nachgewiesen.
NEG	POS	NEG	HSV-2-DNA nachgewiesen. HSV-1- und <i>Treponema pallidum</i> -DNA nicht nachgewiesen.
NEG	NEG	POS	<i>Treponema pallidum</i> -DNA nachgewiesen. HSV-1- und HSV-2-DNA nicht nachgewiesen.
NEG	NEG	NEG	HSV-1, HSV-2- und <i>Treponema pallidum</i> -DNA nicht nachgewiesen.
UNR	UNR	UNR	Unresolved (UNR): Ungelöstes Testergebnis aufgrund der Gegenwart von Hemmsubstanzen in der PCR-Reaktion oder eines allgemeinen (nicht durch einen Fehlercode angezeigten) Problems bei der Probenverarbeitung und/oder den Amplifikationsschritten. ¹
IND	IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Nicht bestimmbarer Testergebnis. Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines mit einem Fehlercode verbundenen Gerätefehlers angezeigt. ²
INC	INC	INC	Incomplete assay result (INC). Unvollständiges Testergebnis. Aufgrund einer Störung im BD MAX™ System. Das Testergebnis wird im Falle eines nicht vollständig durchgeföhrten Durchlaufs angezeigt. ²

Tabelle 14. Probenauswertung.

1 Die endogene interne Kontrolle (EIC) muss ein Amplifikationssignal mit einem Ct-Wert ≤ 40 aufweisen, um berücksichtigt zu werden. Wenn zu EIC kein Signal vorhanden ist oder der Ct-Wert > 40 beträgt, gilt das Ergebnis als Unresolved (UNR, unklar), und der Test muss wiederholt werden. Es wird empfohlen, den Test aus demselben Sample Buffer Tube (SBT), aus derselben Probe mit einem neuen SBT oder aus einer neuen Probe (konzentrierter, falls möglich) zu wiederholen. Es kann außerdem vorkommen, dass das Ergebnis Unresolved (UNR, Unklar) auf das Vorhandensein von Inhibitoren in der PCR-Reaktion zurückzuführen ist. In diesen Fällen wird empfohlen, diese Proben 1:10 zu verdünnen.

HINWEIS: Natürliche Proben von Hautläsionen können ohne Überführung in das SBT bis zu 48 Stunden lang bei $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$ bis $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (ausgedrückt in ESwab® von Copan) aufbewahrt werden. Bei einem wiederholten Testlauf aus demselben SBT wird empfohlen, das SBT manuell zu schütteln, um eine gründliche Homogenisierung der Probe sicherzustellen. Bitte beachten Sie, dass natürliche Proben von Hautläsionen im SBT bis zu 7 Tage lang bei $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$ bis $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden können.

2 Infolge eines Systemausfalls können indeterminierte (IND) oder unvollständige (INC) Ergebnisse erzielt werden, woraufhin dann eine erneute Testung erforderlich ist. Informationen zur Interpretation von Warn- und Fehlercodes finden Sie im Benutzerhandbuch zum System BD MAX™.

Hinweis: Bei Verwendung externer Kontrollen sollten diese die folgenden erwarteten Ergebnisse liefern: negativ für ENC und positiv für EPC (es wird erwartet, dass bekannte positive Proben nur für den/die in der Probe vorhandenen Mikroorganismus/Mikroorganismen positiv sind). Eine ENC, die ein positives Testergebnis liefert, deutet auf ein Kontaminationseignis oder einen Fehler bei der Handhabung der Probe hin. Eine EPC, die ein negatives Ergebnis liefert, deutet auf ein Problem bei der Handhabung/Vorbereitung der Probe hin. Überprüfen Sie die Technik zur Handhabung/Vorbereitung der Proben. Wenn es zu einem Ausfall einer externen Kontrolle kommt, ist eine erneute Testung erforderlich.

Im Falle eines weiterhin zweifelhaften Ergebnisses wird empfohlen, die Gebrauchsanweisung und das vom Benutzer verwendete Extraktionsverfahren zu prüfen, die ordnungsgemäße Ausführung aller PCR-Schritte sowie die Korrektheit der Parameter zu verifizieren und die Sigmoidität der Kurvenform und die Intensität der Fluoreszenz zu kontrollieren.

Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Anamnese, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einem Arzt/einer medizinischen Fachkraft bewertet werden.

10. Grenzen des Tests

- Das Testergebnis muss vor dem Hintergrund der Anamnese, der klinischen Symptome und anderer diagnostischer Tests von einem Arzt/einer medizinischen Fachkraft bewertet werden.
- Dieser Assay kann zwar mit verschiedenen Arten von Proben durchgeführt werden, jedoch wurde er bisher nur für anogenitale und orale Abstrichproben von Hautläsionen validiert.
- Um einen optimalen Ablauf des Tests zu gewährleisten, sollte sich das lyophilisierte Produkt am Boden des Röhrchens befinden und nicht im oberen Bereich des Röhrchens oder an der Verschlussfolie haften. Klopfen Sie jedes Röhrchen leicht auf eine harte Oberfläche, damit sich das gesamte Produkt am Boden des Röhrchens befindet.
- Ein mögliches Übersprechen kann in leeren Kanälen des BD MAX™ Systems beobachtet werden, wenn keine Zielsequenz nachgewiesen werden kann; daher sind bei der Auswertung der Ergebnisse nur die Kanäle auszuwählen, in denen diese amplifiziert wurden. Wenden Sie sich bei Fragen bitte an viasuresupport@certest.es.

- Die Qualität des Tests hängt von der Qualität der Probe ab; die Nukleinsäure muss auf geeignete Weise aus den klinischen Proben extrahiert werden.
- Bei diesem Test handelt es sich um einen qualitativen Test, der weder quantitative Werte liefert noch die Anzahl vorliegender Keime angibt. Es ist nicht möglich, die durch PCR erhaltenen Ct-Werte mit der Konzentration der Probe zu korrelieren, da sie von dem verwendeten Thermocycler und dem Durchlauf selbst abhängen.
- Unter Umständen können extrem niedrige, unterhalb der Nachweisgrenze liegende Kopienzahlen der Zielsequenz nachgewiesen werden, wobei die Ergebnisse eventuell nicht reproduzierbar sind.
- Bitte beachten Sie den vorgesehenen Messbereich des Tests, da Proben mit Konzentrationen oberhalb oder unterhalb dieses Bereichs zu falschen Ergebnissen führen können.
- Es besteht die Möglichkeit von falsch-positiven Ergebnissen aufgrund einer Kreuzkontamination mit HSV-1-, HSV-2- und/oder *T. pallidum*-Proben, die hohe Konzentrationen der Ziel-DNA enthalten, oder aufgrund einer Kontaminierung durch PCR-Produkte früherer Reaktionen.
- Die spezifischen Primer-Sonden-Kombinationen zum Nachweis des *Glycoprotein-L-UL1*-Gens von HSV-1, des *Glycoprotein-G-US4*-Gens von HSV-2 und des *16S-rRNA*-Gens von *T. pallidum*, die im VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System verwendet werden, zeigen keine signifikanten kombinierten Homologien mit dem menschlichen Genom, der menschlichen Mikroflora oder anderen Mikroorganismen, die zu vorhersehbaren falsch-positiven Ergebnissen führen könnten.
- Falsch negative Resultate können sich durch verschiedene Faktoren (auch in Kombinationen) wie die folgenden ergeben:
 - Unsachgemäße Methoden der Entnahme, des Transports, der Lagerung und/oder der Handhabung von Proben.
 - Unsachgemäße Verfahren der Verarbeitung (einschließlich DNA-Extraktion).
 - Abbau der DNA während des Transports/der Lagerung und/oder der Verarbeitung von Proben.
 - Mutationen oder Polymorphismen in Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter HSV-1-, HSV-2- und/oder *T. pallidum*-Stämme beeinträchtigen.
 - Eine mikrobielle Last in der Probe, die unter der Nachweisgrenze des Tests liegt.
 - Das Vorliegen von qPCR-Inhibitoren oder anderen Arten von Störsubstanzen. Der Einfluss von Impfstoffen, bestimmten antiviralen Therapeutika, Antibiotika, Chemotherapeutika, Immunsuppressiva oder auch Antimykotika, die zur Prävention der Infektion oder zur Behandlung eines solchen eingesetzt werden, wurde nicht untersucht.
 - Die Wirkung von Störsubstanzen wurde nur für die in Abschnitt 12.5.1 (Untersuchung von Störsubstanzen) der vorliegenden Gebrauchsanweisungen genannten Substanzen beurteilt. In diesem Abschnitt finden Sie die häufigsten endogenen und exogenen Substanzen, die zu einer

vollständigen oder partiellen Störung der qPCR-Reaktion führen. Andere, nicht in diesem Abschnitt genannte Substanzen könnten falsche Ergebnisse hervorrufen.

- Nichtbefolgen der Gebrauchsanweisung und des Assay-Protokolls.
- Ein positives Testergebnis zeigt nicht unbedingt an, dass lebensfähige Mikroorganismen vorliegen oder diese infektiös oder der Auslöser klinischer Symptome sind. Ein positives Ergebnis weist jedoch auf das Vorhandensein von HSV-1-, HSV-2- und/oder *T. pallidum*-Zielsequenzen hin.
- Negative Ergebnisse schließen das Vorhandensein von HSV-1, HSV-2 und/oder *T. pallidum*-DNA in einer klinischen Probe nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für die Behandlung oder andere Entscheidungen hinsichtlich der Patientenversorgung herangezogen werden. Die optimalen Probentypen und der optimale Zeitpunkt, zu dem bei Infektionen durch HSV-1, HSV-2 und/oder *T. pallidum* mikrobiologische Spitzenwerte vorliegen, sind nicht ermittelt worden. Zum Nachweis des Erregers kann die Entnahme mehrerer Proben (unterschiedlich nach Art und Zeitpunkt) desselben Patienten erforderlich sein.
- Wenn diagnostische Tests auf andere sexuell übertragbare Krankheiten (STD) negativ sind und klinische Befunde, die Anamnese des Patienten sowie die epidemiologischen Informationen nahelegen, dass eine HSV-1, HSV-2 und/oder *T. pallidum*-Infektion möglich ist, sollte ein falsch negatives Ergebnis in Betracht gezogen und ein erneuter Test des Patienten erwogen werden.
- Die Fluoreszenzwerte können aufgrund verschiedener Faktoren variieren, wie z. B.: PCR-Gerät (auch bei gleichem Modell), Extraktionssystem, Art der Probe, vorherige Behandlung der Probe usw.
- Positive und negative prädiktive Werte sind bei allen *In-vitro*-Diagnosetests stark von der Prävalenz abhängig. Die Leistung des *VIASURE HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum Assay for BD MAX™ System* kann je nach Prävalenz und untersuchter Population variieren.
- Im Fall von unklaren (UNR), nicht bestimmbaren (IND) oder unvollständigen (INC) Ergebnissen bei Verwendung des *VIASURE HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum Assay for BD MAX™ System* ist eine Testwiederholung erforderlich. Unklare Ergebnisse (UNR) können durch Hemmsubstanzen in der Probe oder eine nicht korrekte Rehydrierung des lyophilisierten Reaktionsmix-Gefäßes entstehen. Nicht bestimmbare oder unvollständige Ergebnisse sind auf eine Gerätstörung zurückzuführen.

11. Qualitätskontrolle

In jedem Reaktionsgefäß des *VIASURE HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum Assay for BD MAX™ System* ist eine endogene interne Kontrolle (EIC) enthalten, mit der die korrekte Funktionsweise des Tests bestätigt wird. Darüber hinaus lässt sich die Assay-Leistung anhand von externen Kontrollen (EPC und ENC) bestätigen. Externe Kontrollen werden vom *BD MAX™ System* nicht zur Ergebnisauswertung verwendet, sondern als Proben betrachtet. Die externe Positivkontrolle (EPC) dient zur Überwachung eines möglichen Ausfalls der Testreagenzien, während die externe Negativkontrolle (ENC) zum Nachweis einer Kontamination der Umgebung oder der Reagenzien durch Ziel-Nukleinsäuren vorgesehen ist.

12. Analytische Leistungsmerkmale

12.1. Analytische Linearität

Die Linearität des Tests wurde durch Testung einer Reihe von zehnfachen Verdünnungen einer künstlichen Hautläsionsmatrix⁴ (Artificial Matrix for Cutaneous Lesion, Biochemazone BZ394) mit einer bekannten Konzentration (im Bereich von 2E+07 bis 2E+01 Kopien/ μ l) an spezifischer und synthetischer DNA, die zu HSV-1, HSV-2 und *T. pallidum* gehört, bestimmt und bestätigt. Nachfolgend finden Sie ein Beispiel für die Amplifikationskurve, die sich aus einem Assay ergibt:

Abbildung 2. Verdünnungsreihe eines HSV-1-Templates (2E+07 bis 2E+01 Kopien/ μ l), analysiert auf dem BD MAX™ System (Kanal 475/520 (FAM)).

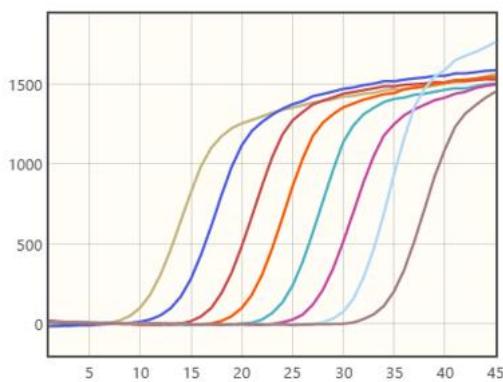
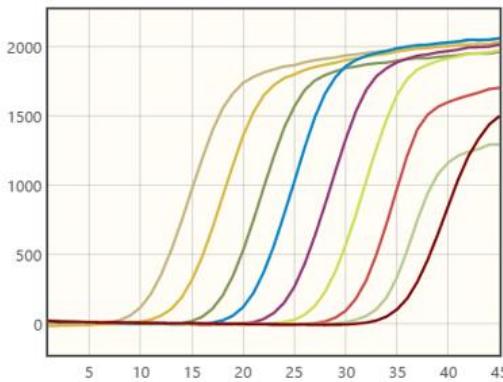
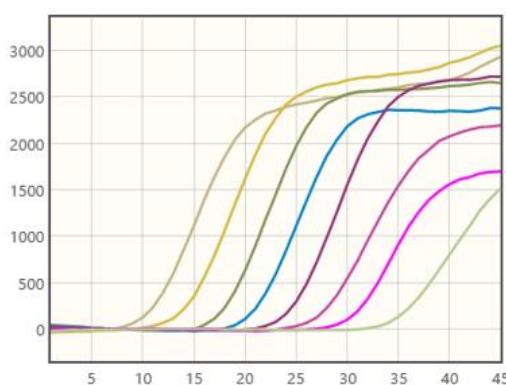


Abbildung 3. Verdünnungsreihe eines HSV-2-Templates (2E+07 bis 2E+01 Kopien/ μ l), analysiert auf dem BD MAX™ System (Kanal 530/565 (HEX)).



⁴ Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von Abstrichen von anogenitalen und oralen Hautläsionen wurde eine Äquivalenzstudie mit natürlichen versus künstlichen Matrices durchgeführt, um zu bestätigen, dass die künstliche Matrix in Validierungstests verwendet werden kann. Daher wurden sowohl die natürlichen als auch die künstlichen Matrices getestet und als gleichwertig bestätigt.

Abbildung 4. Verdünnungsreihe eines *T. pallidum*-Templates (2E+07 bis 2E+01 Kopien/µl), analysiert auf dem BD MAX™ System (Kanal 630/665 (Cy5)).



12.2. Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität wird häufig als Nachweisgrenze (LoD) bezeichnet. In der Praxis werden Parameter für LoD (Nachweisgrenze) und LoB (Erfassungsgrenze) als Teil der Bewertung der analytischen Sensitivität bestimmt.

12.2.1. Erfassungsgrenze (LoB)

Zur Bestimmung der „Erfassungsgrenze“ (LoB) wurde ein Kontrolltest ohne Template mit drei Chargen des VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System und 24 Replikaten von drei Arten von Proben durchgeführt: natürliche Proben von Hautläsionen, künstliche Matrizes von Hautläsionen und RNase/DNase-freies Wasser.

Das Fehlen eines Signals im FAM-, HEX- und Cy5-Kanal sowie das Vorhandensein eines Signals für die endogene interne Kontrolle (EIC) im ROX-Kanal im Fall der negativen Matrix (natürliche oder simulierte Matrix von Hautläsionen) wurde überprüft. Zusammenfassend bestätigen die erhaltenen Ergebnisse, dass das Produkt keine unspezifischen Amplifikationen in den verschiedenen getesteten Matrizes erzeugt.

12.2.2. Nachweisgrenze (LoD)

Die Nachweisgrenze (LoD) des VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System wurde mit drei Chargen unter Verwendung von natürlichen Proben von Hautläsionen analysiert. Die verwendeten Referenzstämme waren humanes Herpesvirus 1, Stamm KOS (ATCC® VR-1493, Ref FR-310 (IIRR)), Herpes-simplex-Virus Typ 2, Stamm MS (Ref. 0810006CF (Zeptometrix)) und *Treponema pallidum*, Stamm SS14 (Washington University). Zusammenfassend zeigte der VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System eine LoD von 2,52E+02 TCID50/ml für HSV-1, 6,30E+00 TCID50/ml für HSV-2 und 6,60E+03 Zellen/ml für *T. pallidum* mit einer Positivrate von $\geq 95\%$ bei natürlichen Proben von Hautläsionen.

12.3. Messbereich

Der Messbereich des Assays wurde bestimmt, indem eine Reihe von zehnfachen Verdünnungen mit einer bekannten Konzentration spezifischer, HSV-1, HSV-2 und *T. pallidum* zugehöriger DNA getestet wurde. Die Ergebnisse ermöglichen die Bestätigung des korrekten Nachweises der Zielsequenzen von 2E+07 bis 2E+00 Kopien/µl für die Ziele HSV-1 und *T. pallidum* sowie von 2E+07 bis 2E-01 Kopien/µl für das Ziel HSV-2.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Messbereich des VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System erfolgreich bestimmt wurde, was zuverlässige, genaue und reproduzierbare Ergebnisse über ein breites Spektrum von Virus-/Bakterienlasten hinweg sicherstellt und dessen Nutzen in verschiedenen klinischen Diagnoseszenarien bestätigt.

12.4. Genauigkeit

12.4.1. Richtigkeit (Verlässlichkeit)

Die Richtigkeit des VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System wurde durch Testung der nachstehend aufgeführten Referenzmaterialien geprüft, die mit einer Hautläsionsmatrix versetzt wurden.

1. Synthetische DNA-Fragmente

- Synthetisches DNA-Fragment für das *Glycoprotein-L-UL1*-Gen von HSV-1: HSV1.XPC, FAM-Kanal.
- Synthetisches DNA-Fragment für das *Glycoprotein-G-US4*-Gen von HSV-2: HSV2.XPC, HEX-Kanal.
- Synthetisches DNA-Fragment für das *16S-rRNA*-Gen von *T. pallidum*: TREXPC, Cy5-Kanal.

Alle synthetischen DNA-Fragmente wurden korrekt im entsprechenden Kanal nachgewiesen.

2. American Type Culture Collection (ATCC®)

Externe Referenz	Mikroorganismus	Produktnamen	Varianten	Ergebnis
VR-1493	Herpes-simplex-Virus Typ 1	Human Herpesvirus 1	Stamm KOS	Nachgewiesen
VR-260	Herpes-simplex-Virus Typ 1	Human Herpesvirus 1	Stamm HF	Nachgewiesen
VR-539	Herpes-simplex-Virus Typ 1	Human Herpesvirus 1	Stamm MacIntyre	Nachgewiesen
VR-733	Herpes-simplex-Virus Typ 1	Human Herpesvirus 1	Stamm F	Nachgewiesen
VR-3393	Herpes-simplex-Virus Typ 2	Human Herpesvirus 2	Stamm G	Nachgewiesen
VR-1779	Herpes-simplex-Virus Typ 2	Human Herpesvirus 2	Stamm ATCC-2011-2	Nachgewiesen
BAA-2642SD	<i>Treponema pallidum</i>	Quantitative Synthetic <i>Treponema pallidum</i> DNA	n. a.	Nicht nachgewiesen

Tabelle 15. Referenzmaterial von der American Type Culture Collection (ATCC®).

Alle Stämme von der ATCC wurden korrekt im entsprechenden Kanal nachgewiesen, wobei die EIC eine Amplifikation mit einem Ct-Wert ≤ 40 zeigte, außer für die Quantitative Synthetic *Treponema pallidum* DNA (ATCC-Code BAA-2642SD). Diese synthetische DNA umfasst Fragmente des *polA*-Gens, des *23S*-Gens, des *16S*-Gens, des *flaA*-, des 47kDa-Protein-Gens und des *bmp*-Gens. Das Fehlen eines Nachweises bei sehr hoher Konzentration (bis zu 4,70E+04 Kopien/ μ l) bei Verwendung des VIASURE Assays deutet jedoch darauf hin, dass die Zielregion innerhalb des *16S*-Gens nicht in der synthetischen DNA der ATCC enthalten ist. Daher kann sie nicht als Referenzmaterial verwendet werden.

3. National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)

Externe Referenz	Mikroorganismus	Produktnname	Varianten	Ergebnis
16/368	Herpes-simplex-Virus Typ 1	1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-1 (HSV-1)	n. a.	Nachgewiesen
17/122	Herpes-simplex-Virus Typ 2	1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-2 (HSV-2)	n. a.	Nachgewiesen

Tabelle 16. Referenzmaterial vom National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC).

Alle Stämme von der NIBSC wurden korrekt im entsprechenden Kanal nachgewiesen, wobei die EIC eine Amplifikation mit einem Ct-Wert ≤ 40 zeigte.

4. Kontrollmaterial

Externe Referenz	Herkunft	Mikroorganismus	Produktnname	Varianten	Ergebnis
0810006CF	ZeptoMetrix	Herpes-simplex-Virus Typ 2	Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2)	Stamm MS	Nachgewiesen
MBC109	Vircell S.L.	<i>Treponema pallidum</i>	AMPLIRUN® TREPONEMA PALLIDUM DNA CONTROL	n. a.	Nachgewiesen
n. a.	University of Washington	<i>Treponema pallidum</i>	Heat-killed <i>Treponema pallidum</i>	Stamm Nichols	Nachgewiesen
n. a.	University of Washington	<i>Treponema pallidum</i>	Heat-killed <i>Treponema pallidum</i>	Stamm SS14	Nachgewiesen

Tabelle 17. Kontrollmaterial für HSV-2 und *T. pallidum* von Vircell S.L., ZeptoMetrix und University of Washington.

Alle Stämme und verwendeten Referenzmaterialien wurden korrekt im entsprechenden Kanal nachgewiesen, wobei die EIC eine Amplifikation mit einem Ct-Wert ≤ 40 zeigte.

12.4.2. Präzision

Zur Bestimmung der Präzision des VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System wurden Intra-Assay- (Wiederholbarkeit), Inter-Assay-, Inter-Batch- und Inter- Thermocycler-Tests (Reproduzierbarkeit) mit einer künstlichen Hautläsionsmatrix durchgeführt, die mit den Referenzstämmen Humanes Herpesvirus 1, Stamm KOS (ATCC® VR-1493, Ref FR-310 (IRR)), Herpes-simplex-Virus Typ 2, Stamm MS (Ref, 0810006CF (Zeptometrix)) und *Treponema pallidum*, Stamm SS14 (Washington University) versetzt war.

Intra-Assay

Der Intra-Assay wurde durch Analyse von sechs Replikaten sämtlicher Proben desselben Durchlaufs unter Verwendung des VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System geprüft. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in nachstehender Tabelle aufgeführt.

Zielsequenz	Kanal	Probentyp	Ct (\bar{x})	σ	CV %
HSV-1	475/520 (FAM)	3xLoD	33,32	0,49	1,48
		5xLoD	32,93	0,12	0,37
		Negativkontrolle	NEG	n. a.	n. a.
HSV-2	530/565 (HEX)	3xLoD	31,08	0,40	1,28
		5xLoD	32,00	0,24	0,74
		Negativkontrolle	NEG	n. a.	n. a.
EIC	585/630 (ROX)	3xLoD	30,42	0,15	0,48
		5xLoD	29,90	0,48	1,60
		Negativkontrolle	NEG	n. a.	n. a.
<i>Treponema pallidum</i>	630/665 (Cy5)	3xLoD	34,17	0,55	1,61
		5xLoD	31,95	0,43	1,35
		Negativkontrolle	NEG	n. a.	n. a.

Tabelle 18. Intra-Assay-Ergebnisse des VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = Schwellenwertzyklus. (\bar{x}) = arithmetisch gemittelter Ct-Wert, (σ) = Standardabweichung, (CV %) = Variationskoeffizient, NEG = negativ, n. a. = entfällt.

Inter-Assay

Zur Bestimmung des Inter-Assay wurden vier Replikate der verschiedenen Proben an drei verschiedenen Tagen von drei verschiedenen Bedienpersonen mit dem VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System getestet. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in nachstehender Tabelle aufgeführt.

Zielsequenz	Kanal	Probentyp	Ct (\bar{x})	σ	CV %
HSV-1	475/520 (FAM)	3xLoD	33,21	0,47	1,41
		5xLoD	31,85	0,78	2,43
		Negativkontrolle	NEG	n. a.	n. a.
HSV-2	530/565 (HEX)	3xLoD	33,83	0,56	1,66
		5xLoD	32,68	0,48	1,48
		Negativkontrolle	NEG	n. a.	n. a.
EIC	585/630 (ROX)	3xLoD	29,82	0,43	1,43
		5xLoD	29,94	0,40	1,33
		Negativkontrolle	29,78	0,46	1,54
<i>Treponema pallidum</i>	630/665 (Cy5)	3xLoD	32,61	1,07	3,29
		5xLoD	31,86	1,24	3,88
		Negativkontrolle	NEG	n. a.	n. a.

Tabelle 19. Inter-Assay-Ergebnisse des VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = Schwellenwertzyklus. (\bar{x}) = arithmetisch gemittelter Ct-Wert, (σ) = Standardabweichung, (CV %) = Variationskoeffizient, NEG = negativ, n. a. = entfällt.

Inter-Batch

Die Inter-Batch-Werte wurden mit sechs Replikaten der verschiedenen Proben unter Verwendung von drei Chargen des VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System bestimmt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in nachstehender Tabelle aufgeführt.

Zielsequenz	Kanal	Probentyp	Ct (\bar{x})	σ	CV %
HSV-1	475/520 (FAM)	3xLoD	33,26	0,46	1,38
		5xLoD	33,29	0,33	1,00
		Negativkontrolle	NEG	n. a.	n. a.
HSV-2	530/565 (HEX)	3xLoD	30,98	0,86	2,78
		5xLoD	32,70	0,58	1,79
		Negativkontrolle	NEG	n. a.	n. a.
EIC	585/630 (ROX)	3xLoD	30,04	0,57	1,89
		5xLoD	30,26	0,56	1,86
		Negativkontrolle	29,97	0,69	2,31
<i>Treponema pallidum</i>	630/665 (Cy5)	3xLoD	33,53	0,76	2,26
		5xLoD	32,24	0,55	1,69
		Negativkontrolle	NEG	n. a.	n. a.

Tabelle 20. Inter-Batch-Ergebnisse des VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = Schwellenwertzyklus. (\bar{x}) = arithmetisch gemittelter Ct-Wert, (σ) = Standardabweichung, (CV %) = Variationskoeffizient, NEG = negativ, n. a. = entfällt.

Inter- Thermocycler

Die Inter-Thermocycler-Werte wurden anhand von vier Replikaten derselben Proben, die bei den Intra-Assay-, Inter-Assay- und Inter-Batch-Assays verwendet wurden, mit dem VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System und drei verschiedenen BD MAX™ System bestimmt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in nachstehender Tabelle aufgeführt.

Zielsequenz	Kanal	Probentyp	Ct (\bar{x})	σ	CV %
HSV-1	475/520 (FAM)	3xLoD	33,71	0,52	1,54
		5xLoD	32,68	0,59	1,79
		Negativkontrolle	NEG	n. a.	n. a.
HSV-2	530/565 (HEX)	3xLoD	33,56	0,80	2,39
		5xLoD	32,65	0,42	1,28
		Negativkontrolle	NEG	n. a.	n. a.
EIC	585/630 (ROX)	3xLoD	29,51	0,77	2,59
		5xLoD	29,23	0,39	1,33
		Negativkontrolle	29,98	0,52	1,75
<i>Treponema pallidum</i>	630/665 (Cy5)	3xLoD	32,28	0,62	1,93
		5xLoD	31,19	0,40	1,29
		Negativkontrolle	NEG	n. a.	n. a.

Tabelle 21. Inter-Equipment-Ergebnisse des VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = Schwellenwertzyklus. (\bar{x}) = arithmetisch gemittelter Ct-Wert, (σ) = Standardabweichung, (CV %) = Variationskoeffizient, NEG = negativ, n. a. = entfällt.

Die Ergebnisse der Präzisionsstudie bestätigten die zuverlässige Leistung und die Konsistenz des VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

12.4.3. Genauigkeit

Das Genauigkeitsexperiment wurde durch die Analyse von Panels aus Programmen zur externen Qualitätsbewertung (EQA) durchgeführt. Es wurden Proben analysiert, die HSV-1, HSV-2 oder *T. pallidum* sowie andere nicht-zielgerichtete Mikroorganismen enthielten. Alle in der folgenden Tabelle dargestellten Testergebnisse wurden mit den Abschlussberichten der Organisatoren der EQA-Programme verglichen.

Zielsequenz	ORA	TP	TN	FP	FN	PPA	NPA
HSV-1	1 (0,51–1)	4	30	0	0	1 (0,40–1)	1 (0,88–1)
HSV-2	1 (0,90–1)	12	22	0	0	1 (0,74–1)	1 (0,85–1)
<i>Treponema pallidum</i>	0,97 (0,85–0,99)	7	26	0	1	0,88 (0,47–0,99)	1 (0,87–1)

Tabelle 22. Genauigkeitsergebnisse anhand von VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (ORA) = Gesamtübereinstimmung, (TP) = richtig positiv, (TN) = richtig negativ, (FP) = falsch positiv, (FN) = falsch negativ, (PPA) = prozentuale Übereinstimmung positiver Proben, (NPA) = prozentuale Übereinstimmung negativer Proben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System eine hohe Genauigkeit bei der Erkennung der DNA von HSV-1, HSV-2 und *T. pallidum* bietet, wobei ausgezeichnete NPA- und PPA-Werte über alle getesteten Stämme hinweg vorliegen.

12.5. Analytische Spezifität und Reaktivität

Die analytische Spezifität und analytische Reaktivität wurden für den VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System *in silico* und experimentell unter Verwendung von unterschiedlichem Ausgangsmaterial wie zertifizierten Referenzstämmen, zertifizierter Referenz-RNA/DNA und Material aus den EQA-Programmen bewertet.

12.5.1. Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität bezeichnet das Vermögen des Assays, das beabsichtigte Ziel zu erkennen. Für die analytische Spezifität sind vier Komponenten zu berücksichtigen: Kreuzreakтивität, Koinfektion, interferierende mikrobielle Agenzen und Substanzinterferenz. Kreuzreakтивität kann auftreten, wenn genetisch verwandte Mikroorganismen in einer Patientenprobe vorhanden sind, während mikrobielle Interferenz auftreten kann, wenn diese genetisch verwandten Mikroorganismen die Erkennung der Zielmikroorganismen verändern, wenn sie vorhanden sind. In ähnlicher Weise soll die Koinfektionsstudie bewerten, ob Zielmikroorganismen in unterschiedlichen Konzentrationen in derselben Probe die Erkennung zwischen ihnen verändern könnten. Schließlich kann eine Substanzinterferenz auftreten, wenn das Vorhandensein spezifischer Substanzen, die möglicherweise in der Probenmatrix vorhanden sind, die Leistung der qPCR beeinträchtigt.

In-silico-Analyse der Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivität wurde anhand von Referenzsequenzen der Erreger aus der NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) und mit Alignment-Tools wie der internen bioinformatischen Analysesoftware BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) beurteilt.

Die nachfolgenden Ergebnisse stellen nur Sequenzen mit einer prozentualen Homologie von über 80 % dar. Der Nachweis von alignierten Sequenzen mit alignierter prozentualer Homologie von weniger als 80 % wurde als unwahrscheinlich eingestuft.

Treponema pallidum

Alle analysierten Sequenzen wiesen eine Homologie von weniger als 80 % mit dem Primer- und Sondenset des *T. pallidum* auf.

Die *in silico*-Kreuzreaktivitätsanalyse ergab eine 100%ige Homologie mit *Treponema paraluisuniculi* (Taxid-ID: 53435 und 545766). Eine NCBI-Suche ergab jedoch, dass diese Sequenzen heterotypisch oder taxonomisch synonym sind und auch *Treponema pallidum* entsprechen.

Keine der analysierten Sequenzen, einschließlich derjenigen mit einer Homologie von über 80 %, konnte daher die korrekte Erkennung des *Treponema pallidum* beeinträchtigen.

Humanes Alphaherpesvirus 1

Alle analysierten Sequenzen wiesen eine Homologie von weniger als 80 % mit dem Primer- und Sondenset des HSV-1 auf.

Die *in silico*-Kreuzreaktivitätsanalyse ergab eine 98,33%ige Homologie mit dem Macacine Alphaherpesvirus 1 Stamm 105640 (Taxid-ID: 332937). Der Wirt dieses Stammes des Alphaherpesvirus ist der Schimpanse (*Pan troglodytes*). Herpesviren sind hochwirtsspezifisch und teilen eine lange synchrone Evolution mit ihren Wirten. Dieser Virus wurde nicht beim Menschen nachgewiesen und gilt vorläufig nicht als zoonotisches Virus, sodass er den Nachweis von HSV-1 nicht beeinträchtigt.

Keine der analysierten Sequenzen, einschließlich derjenigen mit einer Homologie von über 80 %, konnte daher die korrekte Erkennung von HSV-1 beeinträchtigen.

Humanes Alphaherpesvirus 2

Alle analysierten Sequenzen wiesen eine Homologie von weniger als 80 % mit dem Primer- und Sondenset des HSV-2 auf.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zielsequenzen von HSV-1, HSV-2 und *T. pallidum* des VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System keine falsch positiven Ergebnisse beim

Nachweis von *Treponema pallidum*, humanem Alphaherpesvirus 1 und humanem Alphaherpesvirus 2 verursachen sollten, wenn andere Organismen vorhanden sind.

analytische Spezifität: experimentelle Tests

Kreuzreaktivität: experimentelle Tests

Die Kreuzreaktivität des VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System wurde durch das Testen eines Panels verschiedener Mikroorganismen überprüft, die mit Symptomen sexuell übertragbarer Infektionen oder mit phylogenetisch relevanten Mikroorganismen assoziiert sind. Falls möglich und falls entsprechende Konzentrationsdaten verfügbar waren, wurden die interferierenden Mikroorganismen auf medizinisch relevante Konzentrationen hin ausgewertet (in der Regel 1E+05–1E+06 KBE (koloniebildende Einheit)/ml für Bakterien/Pilze und 1E+04–1E+05 PBE (Plaque-bildende Einheit)/ml für Viren). Mit Ausnahme der anvisierten Mikroorganismen wurde zwischen keinem der nachfolgenden untersuchten Mikroorganismen eine Kreuzreaktivität festgestellt.

Test auf Kreuzreaktionen				
<i>Acinetobacter baumannii</i> 5377 [NCDC KC 755]	–	Haemophilus influenzae Stamm L-378	–	<i>Listeria monocytogenes</i> Serotyp 4b
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius 1863 CECT 2071	–	Hepatitis A HM175/18f	–	Affenpockenvirus
<i>Atopobium vaginae</i>	–	Herpes-simplex-Virus Typ 1 1st WHO IS for HSV-1	+	<i>Mycoplasma genitalium</i> Stamm M30
<i>Bacteroides fragilis</i>	–	Herpes-simplex-Virus Typ 2 1st WHO IS for HSV-2	+	<i>Mycoplasma hominis</i> Stamm LBD-4
<i>Candida albicans</i>	–	Herpesvirus 2 Stamm MS	+	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> Stamm NCTC 8375 [B 5025]
<i>Candida glabrata</i>	–	Humanes Herpesvirus 1 Stamm HF	+	<i>Neisseria meningitidis</i> Stamm M2091
<i>Candida krusei</i> Issatchenkovia orientalis Kudryavtsev 1960 CECT 1433	–	Humanes Herpesvirus 1 Stamm F	+	<i>Proteus mirabilis</i> NCDC 2059-70
<i>Candida parapsilosis</i>	–	Humanes Herpesvirus 1 Stamm KOS (ATCC-VR-1493)	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Stamm RH 815
<i>Candida tropicalis</i> (Castellani) Berkhout 1923 CECT 1005	–	Humanes Herpesvirus 1 Stamm MacIntyre	+	<i>Serratia marcescens</i> subsp. marcescens
<i>Chlamydia trachomatis</i> Serotyp E	–	Humanes Herpesvirus 2 Stamm ATCC-2011-2	+	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus, Stamm Seattle 1945
<i>Citrobacter freundii</i>	–	Humanes Herpesvirus 2 Stamm G	+	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Stamm 810-2
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. cloacae	–	Humanes Papillomavirus 16	–	<i>Treponema pallidum</i> DNA Control, Vircell
<i>Enterococcus faecalis</i> Referenzstamm CECT 8120	–	Humanes Papillomavirus 18	–	<i>Treponema pallidum</i> Stamm Nichols
<i>Enterococcus faecium</i> vanA, Stamm CECT 5253	–	<i>Klebsiella oxytoca</i> Stamm MIT 10-5243	–	<i>Treponema pallidum</i> Stamm SS14
Epstein-Barr-Virus 1st WHO IS for Epstein-Barr Virus EBV	–	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Stamm UHKPC57	–	<i>Trichomonas vaginalis</i> , QCMD TV18S-01
<i>Escherichia coli</i> Referenzstamm	–	<i>Listeria innocua</i>	–	<i>Ureaplasma urealyticum</i> T-Stamm 960 (CX8) [960, CIP 103755, NCTC 10177]

Test auf Kreuzreaktionen				
<i>Gardnerella vaginalis</i> 594 [NCTC 10287]	-	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>londoniensis</i>	-	Varicella-Zoster-Virus, Stamm Ellen
<i>Haemophilus ducreyi</i> Klasse I	-	<i>Listeria monocytogenes</i> Serotyp 1/2	-	

Tabelle 23. Referenz pathogene Mikroorganismen, die in den Kreuzreaktivitätstest einbezogen wurden. Das Ergebnis +/- bezieht sich auf das positive oder negative Ergebnis, das in den verschiedenen Kanälen abhängig von der nachgewiesenen Zielsequenz ermittelt wird. Handelt es sich bei einem getesteten Mikroorganismus um eine der durch das Gerät erfassten Zielsequenzen, wird ein positives Ergebnis in dem entsprechenden Kanal ermittelt, während in den anderen Kanälen ein negatives Ergebnis ermittelt wird.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Kreuzreaktivitätsanalysen auf eine hohe Spezifität des VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System hin, wodurch das Risiko von falsch-positiven Ergebnissen minimiert wird. Da bei anderen verwandten Mikroorganismen keine unspezifischen Amplifikationen beobachtet wurden, deutet dies darauf hin, dass das Produkt in der Lage ist, die Zielsequenzen präzise zu unterscheiden.

Koinfektionsstudie

Es wurde eine Studie zur Koinfektion mit dem Humanen Herpesvirus 1, Stamm KOS (ATCC® VR-1493, Ref FR-310 (IRR)), Herpes-simplex-Virus Typ 2, Stamm MS (Ref, 0810006CF (Zeptometrix)) und *Treponema pallidum*, Stamm SS14 (Washington University) in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt, um zu bestätigen, dass das Vorhandensein eines dieser Erreger, unabhängig von der Konzentration, die Erkennung zwischen ihnen nicht verändert. Es wurden drei natürliche Hautläsionsproben als Negativmatrix versetzt mit dem Referenzmaterial analysiert, wobei eine Zielsequenz in niedriger Konzentration (3xLoD) und die übrigen Zielsequenzen in sehr hoher Konzentration, in der Regel 1E+04–1E+05 Einheiten/ml, vorlagen.

Die Ergebnisse bestätigen, dass die Erkennung der Zielmikroorganismen keinen Änderungen unterliegt, wenn sie bei einer Koinfektion in verschiedenen Konzentrationen mit dem VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System analysiert werden.

Untersuchung von interferierenden mikrobiellen Agenzien

Es wurde eine Studie zur mikrobiellen Interferenz durchgeführt, um die potenziell interferierenden mikrobiellen Agenzien für den VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System zu analysieren. Ein Panel von verschiedenen klinisch, umwelt- und phylogenetisch relevanten Mikroorganismen wurde in Gegenwart von HSV-1-, HSV-2- und *T.-pallidum*- Zielen getestet, was unter Verwendung einer natürlichen Hautläsionsprobe als Negativmatrix versetzt mit Humanem Herpesvirus 1, Stamm KOS (ATCC® VR-1493, Ref FR-310 (IRR)), Herpes-simplex-Virus Typ 2, Stamm MS (Ref, 0810006CF (Zeptometrix)) und *Treponema pallidum*, Stamm SS14 (Washington University) durchgeführt wurde. Nach Möglichkeit und bei Verfügbarkeit von Konzentrationsdaten wurden die störenden Viren, Bakterien und/oder Pilze auf medizinisch relevanten Niveaus bewertet (in der Regel 1E+05–1E+06 KBE/ml für Bakterien und 1E+04–1E+05 PBE/ml für Viren).

Eine positive und eine negative Matrixkontrolle (Positive Matrix Control, PMC bzw. Negative Matrix Control, NMC) wurden zur Überprüfung in den Test aufgenommen. Die PMC entspricht der negativen Matrix, die mit spezifischen Zielstämmen versetzt ist, ohne dass eine interferierende mikrobielle Substanz vorliegt, während die NMC der negativen Matrix ohne eine interferierende mikrobielle Substanz entspricht.

Bezeichnung des Mikroorganismus	Getestete Konzentration	Ergebnis
PMC	n. a.	K. Int.
NMC	n. a.	K. Int.
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Nicht verfügbar	K. Int.
<i>Atopobium vaginæ</i>	4,52E+03 KBE/µl	K. Int.
<i>Candida albicans</i>	4,18E+03 KBE/µl	K. Int.
<i>Candida glabrata</i>	2,46E+03 KBE/µl	K. Int.
<i>Candida parapsilosis</i>	Nicht verfügbar	K. Int.
<i>Candida tropicalis</i>	3,04E+04 Kopien/µl	K. Int.
<i>Chlamydia trachomatis Serotyp E</i>	3,20E+06 IFE/ml	K. Int.
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,28E+03 KBE/µl	K. Int.
1st WHO IS for Epstein-Barr Virus EBV	5,00E+04 IE/ml	K. Int.
<i>Gardnerella vaginalis</i> 594 [NCTC 10287]	4,40E+05 KBE/ml	K. Int.
<i>Haemophilus ducreyi</i> Klasse I	1,40E+02 Kopien/µl	K. Int.
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,20E+03 KBE/µl	K. Int.
Hepatitis A	2,80E+03 TCID50/µl	K. Int.
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Nicht verfügbar	K. Int.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Nicht verfügbar	K. Int.
<i>Listeria innocua</i>	Nicht verfügbar	K. Int.
<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>londoniensis</i>	Nicht verfügbar	K. Int.
<i>Listeria monocytogenes</i> (CECT 4031)	2,90E+03 KBE/µl	K. Int.
<i>Listeria monocytogenes</i> (CECT 935)	2,70E+03 KBE/µl	K. Int.
<i>Mycoplasma hominis</i>	4,40E+03 KBE/µl	K. Int.
<i>Mycoplasma genitalium</i>	3,80E+03 KBE/µl	K. Int.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6,20E+03 KBE/µl	K. Int.
<i>Neisseria meningitidis</i>	5,70E+04 KBE/µl	K. Int.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,90E+04 KBE/µl	K. Int.
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,60E+04 KBE/µl	K. Int.
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	9,20E+03 KBE/µl	K. Int.
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	2,00E+04 KBE/µl	K. Int.
<i>Acinetobacter baumannii</i> 5377 [NCDC KC 755]	8,10E+05 KBE/ml	K. Int.
<i>Bacteroides fragilis</i>	3,40E+02 Kopien/µl	K. Int.
<i>Enterococcus faecalis</i> Referenzstamm	5,00E+05 KBE/ml	K. Int.
<i>Enterococcus faecium</i> vanA	3,50E+05 KBE/ml	K. Int.
Humanes Papillomavirus 16	1,00E+03 IE/µl	K. Int.
Humanes Papillomavirus 18	1,00E+03 IE/µl	K. Int.
<i>Serratia marcescens</i>	2,30E+05 KBE/ml	K. Int.
Varicella-Zoster-Virus	7,26E+04 KBE/ml	K. Int.

<i>Citrobacter freundii</i> Referenzstamm	6,20E+02 KBE/µl	K. Int.
<i>Escherichia coli</i> Referenzstamm	5,20E+02 KBE/µl	K. Int.
<i>Proteus mirabilis</i>	2,55E+01 KBE/µl	K. Int.
Affenpockenvirus	1,50E+03 Kopien/ml	K. Int.

Tabelle 24. Test auf störende mikrobielle Agenzen. K. Int. = Keine Interferenz, (PMC) = positive Matrixkontrolle, (NMC) = negative Matrixkontrolle, (TCID50) = Tissue Culture Infectious Dose 50 % (Infektionsdosis 50 % bei Gewebekultur), (IU) = Internationale Einheiten, (KBE) = koloniebildende Einheiten, (Kp) = Kopien, (IFU) = Infektionseinheit.

Es wurden somit bei keinem der getesteten Mikroorganismen Störungen beim Nachweis der Ziel-Nukleinsäure beobachtet.

Studie zu Störsubstanzen

Um eine potentiell störende Wirkung von endogenen und exogenen Substanzen auf das VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System zu testen, wurde eine Untersuchung von Störsubstanzen durchgeführt. Insgesamt wurden 22 potenzielle Störsubstanzen zu der natürlichen Hautläsion als Negativmatrix gegeben, die mit den Referenzstämmen angereichert worden waren: Humanes Herpesvirus 1, Stamm KOS (ATCC® VR-1493, Ref FR-310 (IRR)), Herpes-simplex-Virus Typ 2, Stamm MS (Ref, 0810006CF (Zeptometrix)) und *Treponema pallidum*, Stamm SS14 (Washington University). Dies wurde in sechs Replikaten ausgewertet.

Eine positive und eine negative Matrixkontrolle (Positive Matrix Control, PMC bzw. Negative Matrix Control, NMC) wurden zur Überprüfung in den Test aufgenommen. Die PMC entspricht der negativen Matrix, die mit spezifischen Zielstämmen versetzt ist, ohne dass eine Störsubstanz vorliegt, während die NMC der negativen Matrix ohne Störsubstanz oder ohne Mikroorganismus-/Referenzmaterial-Zugabe entspricht. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

Bezeichnung der Substanz	Getestete Konzentration	Ergebnis
PMC	n. a.	K. Int.
NMC	n. a.	K. Int.
Acyclovir	6,60E-02 mg/ml	K. Int.
Albumin	1,00E+01 mg/ml	K. Int.
Vollblut	1,00E+00 % (v/v)	K. Int.
Leukozyten/Monozyten	1,00E+06 Zellen/ml	K. Int.
Mucin	2,50E+00 mg/ml	K. Int.
Clamox (Hydrokortison)	2,50E+00 mg/ml	K. Int.
Neosayomol (Diphenhydramin)	3,87E-02 mg/ml	K. Int.
Letibalm (Lippenbalsam)	2,50E+00 mg/ml	K. Int.
Kasein	7,00E+00 mg/ml	K. Int.
Hemoal (Benzocain)	2,50E+00 mg/ml	K. Int.
Durex Frescor	5,00E+01 µl/ml	K. Int.

SOIVRE Intimöl	5,00E+01 μ l/ml	I
	1,25E+01 μ l/ml	K. Int.
Liade	7,20E+00 mg/ml	K. Int.
Weibliche Urinprobe	1,00E+01% (v/v)	K. Int.
Männliche Urinprobe	1,00E+01% (v/v)	K. Int.
Stuhl	2,20E-01 % (v/v)	K. Int.
Samenflüssigkeit	5,00E+00 % (v/v)	K. Int.
Heilbutt	2,50E+00 mg/ml	K. Int.
Vagisil-Creme	7,50E-01 mg/ml	K. Int.
Maisstärke	2,50E+00 mg/ml	K. Int.
Talquistina	2,64E+00 % (v/v)	I
	6,60E-01 % (v/v)	I
	3,30E-01 % (v/v)	I
	1,70E-01 % (v/v)	K. Int.
Tioconazol	2,50E+00 mg/ml	K. Int.

Tabelle 25. Potenzielle Störsubstanzen. N.I.: (No reportable interference), Keine relevanten Störungen / I: Interferenzen.

Verschiedene potenzielle Störsubstanzen, endogene wie exogene, wurden auf dem VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System getestet. Bei der Untersuchung von SOIVRE Intimöl bei 50 μ l/ml und Talquistina bei 2,64 % (v/v) wurde eine Interferenz festgestellt. Verdünnungen wurden durchgeführt, bis eine Konzentration erreicht war, bei der diese Interferenzeffekte nicht mehr beobachtet wurden: 12,5 μ l/ml für SOIVRE Intimöl und 0,17 % (v/v) für Talquistina. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass bei den getesteten endgültigen Konzentrationen keine Störung durch die beurteilten Substanzen festgestellt werden kann.

12.5.2. Analytische Reaktivität

Die analytische Reaktivität kann als Prozentsatz der mikrobiellen Zielstämme oder DNA/RNA-Proben definiert werden, die das richtige positive Ergebnis liefern. Die analytische Reaktivität wurde *in silico* und anhand von experimentellen Tests untersucht.

In-silico-Analyse der analytischen Reaktivität

Die analytische Reaktivität des VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System wurde unter Verwendung der öffentlich zugänglichen Nukleotidsequenzdatenbank wie der NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) und einer internen bioinformatischen Analysesoftware bewertet, um zu zeigen, dass die Zielgene durch das zu untersuchende Produkt korrekt nachgewiesen werden können. Die *In-silico*-Analyse des Primer- und Sondendesigns wurde durch ein Alignment mit insgesamt 4.941 analysierten Sequenzen (aus der Datenbank heruntergeladene Sequenzen mit entfernten Duplikaten) für *T.*

pallidum, 9.779 für HSV-1 und 8.689 für HSV-2 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

Treponema pallidum					
Gen	Alignierte Sequenzen: 607				
	Ohne Fehlpaarungen	Mit Fehlpaarungen	Sequenzen mit bestätigtem Nachweis	Sequenzen ohne Nachweis	Sequenzen mit unbekanntem Nachweis
<i>16S rRNA</i>	99,84 %	0,16 %	99,84 %	0 %	0,16 %
Humanes Alphaherpesvirus 1					
Gen	Alignierte Sequenzen: 513				
	Ohne Fehlpaarungen	Mit Fehlpaarungen	Sequenzen mit bestätigtem Nachweis	Sequenzen ohne Nachweis	Sequenzen mit unbekanntem Nachweis
<i>UL1</i>	87,33 %	12,67 %	97,66 %	0 %	2,34 %
Humanes Alphaherpesvirus 2					
Gen	Alignierte Sequenzen: 549				
	Ohne Fehlpaarungen	Mit Fehlpaarungen	Sequenzen mit bestätigtem Nachweis	Sequenzen ohne Nachweis	Sequenzen mit unbekanntem Nachweis
<i>US4</i>	93,44 %	6,56 %	93,44 %	0 %	6,56 %

Tabelle 26. *In-silico*-Tests der analytische Reaktivität „Alignierte Sequenzen“ = Anzahl der Sequenzen, die ohne oder mit Fehlpaarungen aus der Gesamtzahl der analysierten Sequenzen aligniert wurden, „Sequenzen mit bestätigtem Nachweis“ = Sequenzen ohne Fehlpaarungen oder ohne Nassanalyse, deren Nachweis garantiert ist, „Sequenzen ohne Nachweis“ = Sequenzen, die zuvor in silico analysiert wurden und deren experimenteller Nachweis aufgrund früherer negativer experimenteller Belege nicht garantiert werden kann, „Sequenzen mit unbekanntem Nachweis“ = Sequenzen, die zuvor in silico analysiert wurden und deren experimenteller Nachweis aufgrund fehlender experimenteller Belege nicht garantiert werden kann.

Zusammenfassend zeigte die Inklusivitätsanalyse einen korrekten Nachweis der *16S rRNA*-, *UL1*- bzw. *US4*-Gene von *T. pallidum*, HSV-1 bzw. HSV-2 mit dem VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

Analytischen Reaktivität: experimentelle Tests

Die analytische Reaktivität des VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System auf HSV-1 wurde anhand der DNA von Humanes Herpesvirus 1, HF-Stamm (ATCC-Code VR-260), Humanes Herpesvirus 1, Stamm MacIntyre (ATCC-Code VR-539), Humanes Herpesvirus 1, Stamm F (ATCC-Code VR-733) und 1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-1 (HSV-1) (NIBSC 16/368) bewertet, wobei positive Ergebnisse erzielt wurden.

Die analytische Reaktivität des VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System auf HSV-2 wurde anhand der DNA von Humanes Herpesvirus 2, Stamm G (ATCC-Code VR-3393), Humanes Herpesvirus 2, Stamm ATCC-2011-2 (ATCC-Code VR-1779) und 1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-2 (HSV-2) (NIBSC 17/122) bewertet, wobei positive Ergebnisse erzielt wurden.

Die analytische Reaktivität des VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System auf *T. pallidum* wurde anhand der DNA von *Treponema pallidum*, Stamm Nichols (University of Washington) und *Treponema pallidum* DNA Control (Vircell MBC109) bewertet, wobei positive Ergebnisse erzielt wurden.

12.6. Messtechnische Rückführbarkeit

Dieser Assay ist nicht zu Messzwecken ausgelegt.

13. Merkmale der klinischen Leistung

Die klinische Leistung des VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System wurde mit Abstrichen von anogenitalen und oralen Hautläsionen getestet, die vom Pflegepersonal unter Verwendung von Copan eSwab® entnommen wurden. Für die Entnahme wurde der sterile Abstrich (FLOQSwab) in das mitgelieferte Röhrchen mit 1 ml Copan's Liquid Amies Elution Swab gegeben. Als Ergebnisse wurden dabei erhalten:

Standort		Probentyp	Arbeitsablauf	Zielsequenz
1	Certest Biotec S.L. (Zaragoza, Spanien) in Zusammenarbeit mit dem Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza, Spanien) unter Verwendung von Proben der Biobanco del Sistema de Salud de Aragón (BSSA)	Abstrich von anogenitalen und oralen Hautläsionen (Retrospektive Studie)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 Kit + BD MAX™ System	HSV-1
	HSV-2			
	<i>T. pallidum</i>			
2	Certest Biotec S.L. (Zaragoza, Spanien) unter Verwendung von Proben von Cerba Xpert	Abstrich von anogenitalen und oralen Hautläsionen (Retrospektive Studie)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 Kit + BD MAX™ System	HSV-1
	HSV-2			
	<i>T. pallidum</i>			

Tabelle 27. Standort, Probentyp, Arbeitsablauf und Zielsequenzen.

Richtig positive und richtig negative Werte, falsch positive und falsch negative Werte, Sensitivität, Spezifität, positive prädiktive Werte (PPV) und negative prädiktive Werte (NPV) sowie Likelihood-Verhältnisse (LR) für den VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System wurden berechnet. Die Ergebnisse und Analysen der verschiedenen Studien wurden als ein einzelner Referenzwert zusammengefasst, da beide Studien dieselbe Referenzmethode, denselben Probentyp und dieselben Einschluss-/Ausschlusskriterien verwendeten. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

Standort	Vergleichstest	Zielsequenz	TP	TN	FP	FN	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV	LR+	LR-
1+2	Allplex™ Genitalulcus Assay (Seegene)	HSV-1	50	96	0	1	0,98 (0,90–1)	1 (0,96–1)	1 (0,93–1)	0,99 (0,94–0,99)	188,4 (11,86–2992)	0,029 (0,006–0,14)
		HSV-2	49	97	0	1	0,98 (0,89–0,99)	1 (0,96–1)	1 (0,93–1)	0,99 (0,94–0,99)	190,2 (11,98–3021)	0,03 (0,006–0,14)
		<i>T. pallidum</i>	40	106	0	1	0,98 (0,87–0,99)	1 (0,97–1)	1 (0,91–1)	0,99 (0,96–0,99)	206,36 (12,98–3280)	0,036 (0,007–0,173)

Tabelle 28. Richtig positive (TP) und richtig negative (TN) Werte, falsch positive (FP) und falsch negative (FN) Werte, Sensitivität, Spezifität, positive prädiktive Werte (PPV), negative prädiktive Werte (NPV) und Likelihood-Verhältnisse (LR) für den VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine hohe Übereinstimmung beim Nachweis von HSV-1, HSV-2 und *T. pallidum* mit dem VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

Literaturverzeichnis

- CDC. (2023). *Enfermedades de transmisión sexual (ETS)*. <https://www.cdc.gov/std/spanish/sifilis/stdfact-syphilis-s.htm>
- Cole, S. (2020). Herpes Simplex Virus: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Nursing Clinics of North America*, 55(3), 337–345. <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2020.05.004>
- Forrestel, A. K., Kovarik, C. L., & Katz, K. A. (2020). Sexually acquired syphilis: Laboratory diagnosis, management, and prevention. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 82(1), 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2019.02.074>
- Mercuri, S. R., Moliterni, E., Cerullo, A., Di Nicola, M. R., Rizzo, N., Bianchi, V. G., & Paolino, G. (2022). Syphilis: a mini review of the history, epidemiology and focus on microbiota. *New Microbiologica*, 45(1), 28–34.
- Minaya, M. A., Jensen, T. L., Goll, J. B., Korom, M., Datla, S. H., Belshe, R. B., & Morrison, L. A. (2017). Molecular Evolution of Herpes Simplex Virus 2 Complete Genomes: Comparison between Primary and Recurrent Infections GENETIC DIVERSITY AND EVOLUTION crossm. *American Society for Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JVI>
- Peeling, R. W., Mabey, D., Chen, X. S., & Garcia, P. J. (2023). Syphilis. *The Lancet*, 402, 336–346. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02348-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02348-0)
- Radolf, J. D., Deka, R. K., Anand, A., Šmajs, D., Norgard, M. V., & Yang, X. F. (2016). *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete: making a living as a stealth pathogen HHS Public Access. *Nat Rev Microbiol*, 14(12), 744–759. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.141>
- Tudor, M. E., Al Aboud, A. M., & Gossman, W. (2022, July 23). *Syphilis*. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL); StatPearls Publishing. <https://doi.org/10.1016/j.med.2022.04.001>
- WHO. (2023). *Herpes Simplex Virus*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>
- Zhu, S., & Viejo-Borbolla, A. (2021). Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence*, 12(1), 2670–2702. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1982373>

Symbole auf IVD-Komponenten und Reagenzien

IVD	<i>In-vitro-Diagnostikum</i>	 Trocken halten	 Verfallsdatum	 Hersteller	LOT	Chargennummer
 i	Siehe Gebrauchsanweisung	 Temperaturbegrenzung	 Ausreichend für <n> Test(s)	 Eindeutige Gerätenecknung	REF	Bestell-Nr.
 CE	CE-Kennzeichen	 Vor Sonnenlicht schützen				

Marken

BD MAX™ ist eine eingetragene Marke von Becton, Dickinson and Company.

Änderungsrechte vorbehalten. Alle Rechte vorbehalten. © Certest Biotec, S.L.

Alle anderen Marken, die möglicherweise in dieser Packungsbeilage erscheinen, sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.



Certest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1, 50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spanien)

Tel. (+34) 976 520 354 | viasure@certest.es | www.certest.es

Informationen zum australischen Sponsor:

Becton Dickinson Pty Ltd., 66 Waterloo Road.

Macquarie Park NSW 2113, Australien

Informationen zum neuseeländischen Sponsor:

Becton Dickinson Limited, 14B George Bourke Drive.

Wellington Auckland 1060, Neuseeland

Änderungshistorie		
Versionsnr.	Änderungen	Datum
00	Ursprüngliche Version Diese Version ist eine Übersetzung des englischen Originaldokuments: IUo-444222en0725.00.	27.07.2025

Tabelle A 2. Tabelle Änderungshistorie.

Revision: 00



 **Certest Biotec, S.L.**

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, N°1 50840,
San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

 (+34) 976 520 354

 viasure@certest.es

 www.certest.es

certest

F-566 Rev.03

Modification rights reserved. All rights reserved. © Certest Biotec, S.L.
The products, services and data set out in this document may suffer changes
and/or variations on the texts and pictures shown.