

Real Time PCR Detection Kit

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

Instrucciones de uso

CE IVD  
2797

Estas instrucciones de uso aplican para las siguientes referencias:

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

Tabla A 1. Referencia del producto para ser utilizado con el Sistema BD MAX™.

**EN** For download IFUS from other languages, please enter in [certest.es/viasure/labeling](http://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](mailto:viasure@certest.es).

**BG** За да изтеглите IFUS на други езици, моля, отидете на [certest.es/viasure/labeling](http://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](mailto:viasure@certest.es).

**CS** Chcete-li si stáhnout IFUS v jiných jazycích, přejděte na stránku [certest.es/viasure/labeling](http://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](mailto:viasure@certest.es).

**DA** Hvis du vil downloade IFUS på andre sprog, kan du gå til [certest.es/viasure/labeling](http://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](mailto:viasure@certest.es).

**DE** Um den IFUS in anderen Sprachen herunterzuladen, gehen Sie bitte zu [certest.es/viasure/labeling](http://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](mailto:viasure@certest.es).

**EL** Για να κατεβάσετε το IFUS σε άλλες γλώσσες, μεταβείτε στη διεύθυνση [certest.es/viasure/labeling](http://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](mailto:viasure@certest.es).

**ES** Para descargar las IFUS en otros idiomas, por favor, entre en [certest.es/viasure/labeling](http://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](mailto:viasure@certest.es).

**ET** IFUSi allalaadimiseks teistes külastage [certest.es/viasure/labeling](http://certest.es/viasure/labeling). Kui olete seal, järgige juhiseid, et saada juurdepääs vajalikule keelele. Kui vajate lisateavet, võtke palun ühendust: [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es).

**FR** Pour télécharger l'IFUS dans d'autres langues, veuillez vous rendre sur [certest.es/viasure/labeling](http://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](mailto:viasure@certest.es).

**HR** Za preuzimanje IFUS-a s drugih jezika unesite [certest.es/viasure/labeling](http://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](mailto:viasure@certest.es).

**HU** Az IFUS más nyelveken történő letöltéséhez kérjük, látogasson el a **[certest.es/viasure/labeling](https://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](mailto:viasure@certest.es).

**IT** Per scaricare l'IFUS in altre lingue, vai su **[certest.es/viasure/labeling](https://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](mailto:viasure@certest.es).

**LT** Norėdami atsisiųsti IFUS kitomis kalbomis, eikite į **[certest.es/viasure/labeling](https://certest.es/viasure/labeling)**. Ten atlikite nurodymus, kad pasiekumėte reikiama kalba. Jei reikia papildomos informacijos, kreipkitės adresu: [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es).

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

**PT** Para baixar o IFUS em outros idiomas europeus, acesse **[certest.es/viasure/labeling](https://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](mailto:viasure@certest.es).

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

**SV** För att ladda ner IFUS från andra språk, vänligen gå in på **[certest.es/viasure/labeling](https://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](mailto:viasure@certest.es).

**SK** Ak si chcete stiahnuť IFUS v iných jazykoch, prejdite na stránku **[certest.es/viasure/labeling](https://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](mailto:viasure@certest.es).

**FI** Lataa suomeksi turvallinen käyttöopas osoitteesta **[certest.es/viasure/labeling](https://certest.es/viasure/labeling)**. Kun olet siellä, seuraa ohjeita. Jos tarvitset lisätietoja, ota yhteyttä: [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es).

Consulte **[certest.es/viasure/labeling](https://certest.es/viasure/labeling)** si su idioma no está en la lista. Contacte con [viasure@certest.es](mailto:viasure@certest.es) si su idioma no está en la página web.

*Nota: El usuario debe notificar al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido como usuario y/o paciente cualquier incidencia grave relacionada con el producto.*

## Content

1.	Finalidad prevista .....	6
2.	Introducción y explicación .....	6
3.	Procedimiento .....	7
4.	Reactivos suministrados .....	8
5.	Reactivos y equipos a suministrar por el usuario .....	9
6.	Condiciones de transporte, almacenamiento y uso .....	9
7.	Precauciones para el usuario .....	10
8.	Procedimiento del test .....	12
8.1.	Recogida, transporte y almacenamiento de muestras .....	12
8.2.	Preparación de la muestra y extracción de DNA .....	13
8.3.	Protocolo PCR .....	14
8.3.1.	Programación del test VIASURE <i>HSV-1, HSV-2 &amp; Treponema pallidum</i> Assay BD MAX™ System .....	14
8.3.2.	Preparación de la gradilla del sistema BD MAX™ .....	17
8.3.3.	Configuración del instrumento BD MAX™ .....	18
8.3.4.	Informe BD MAX™ .....	19
9.	Interpretación de resultados .....	20
10.	Limitaciones del test .....	22
11.	Control de calidad .....	24
12.	Características analíticas del funcionamiento del test .....	24
12.1.	Linealidad analítica .....	24
12.2.	Sensibilidad analítica .....	25
12.2.1.	Límite de Blanco (LoB) .....	25
12.2.2.	Límite de Detección (LoD) .....	26
12.3.	Rango de medición .....	26
12.4.	Exactitud .....	26
12.4.1.	Veracidad (Sesgo) .....	26
12.4.2.	Precisión .....	28
12.4.3.	Exactitud .....	30

---

12.5. Especificidad y reactividad analítica .....	31
12.5.1. Especificidad analítica .....	31
12.5.2. Reactividad analítica .....	37
12.6. Trazabilidad metrológica .....	38
13. Características del funcionamiento clínico.....	38
Bibliografía.....	40
Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i> .....	41
Marca registrada .....	41

## ESPAÑOL

### 1. Finalidad prevista

VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System es una prueba de qPCR automatizada diseñada para la detección cualitativa y simultánea de DNA del virus herpes simple tipo 1 (VHS-1), virus herpes simple tipo 2 (VHS-2) y/o *Treponema pallidum* (Sífilis) en muestras de hisopos de lesiones cutáneas anogenitales y orales de pacientes con sospecha de infección por VHS-1, VHS-2 y/o *T. pallidum* por su profesional de la salud (PS). El uso previsto del test es ayudar en el diagnóstico de la infección por los microorganismos anteriormente mencionados en combinación con los signos y síntomas clínicos de los pacientes y/o los factores de riesgo epidemiológicos. Los resultados positivos indican la presencia de ácidos nucleicos (NA) diana, pero no excluyen la presencia de otros patógenos no detectados por la prueba. Los resultados negativos no excluyen la presencia de los NA diana y no deben utilizarse como única base para el tratamiento u otras decisiones de gestión del paciente. Este test utiliza el sistema BD MAX™ para llevar a cabo la extracción automatizada del DNA y posterior qPCR utilizando los reactivos suministrados junto con los reactivos universales y desechables del sistema BD MAX™. El DNA es extraído de las muestras, amplificado mediante qPCR y detectado utilizando sondas marcadas con una molécula fluorescente específicas para VHS-1, VHS-2 y *T. pallidum*.

El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado, instruido y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico in vitro (incluida la capacitación en el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácido nucleico).

### 2. Introducción y explicación

Los Virus Herpes Simple humano (VHS) tipos 1 y 2 son dos de los virus humanos más prevalentes en el mundo, comúnmente asociados con enfermedades como herpes labial, herpes genital, queratitis estromal herpética, meningitis y encefalitis (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). VHS afecta primariamente a la piel y las membranas de las mucosas, causando infecciones persistentes que consisten en períodos de quiescencia (latencia) y de enfermedad recurrente (reactivación) (Cole, 2020; Minaya et al., 2017). La transmisión tanto de VHS-1 como de VHS-2 se produce a través del contacto oral, mientras que las infecciones por VHS-2 ocurren más tarde, normalmente mediante transmisión sexual, siendo las manifestaciones clínicas de estos virus muy variables: asintomáticas, leves o potencialmente mortales (Cole, 2020; WHO, 2023; Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). En la mayoría de las personas inmunocompetentes, VHS causa una enfermedad leve que se resuelve sola (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). Sin embargo, la infección por VHS también se asocia con una morbilidad y mortalidad alta en ciertos individuos, como pacientes inmunocomprometidos que sufren infección recurrente por VHS (Cole, 2020; Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). Se ha observado que una infección

con un tipo de VHS generalmente induce inmunidad que evita la reinfección con el mismo serotipo, pero no con el otro (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021).

La espiroqueta *Treponema pallidum* es conocida por ser el agente causante de sífilis venérea, pián, sífilis endémica y pinta, todas ellas infecciones de múltiples etapas que solo pueden diferenciarse mediante criterios clínicos, epidemiológicos y geográficos (Mercuri et al., 2022; Peeling et al., 2023; Radolf et al., 2016; Tudor et al., 2022). *T. p. pertenue* está relacionado con el desarrollo de pián, *T. carateum* con el desarrollo de pinta y *T. p. endemicum* con la sífilis endémica, mientras que *T. pallidum* subespecie *pallidum* es la única asociada a la sífilis venérea (Mercuri et al., 2022; Tudor et al., 2022).

La sífilis es una enfermedad que se desarrolla en varias etapas, cada una caracterizada por signos y síntomas específicos, como chancros en la sífilis primaria y erupciones o úlceras en la secundaria (CDC, 2023; Mercuri et al., 2022; Peeling et al., 2023). De hecho, debido a la variedad de manifestaciones clínicas, la sífilis también es conocida con el sobrenombre de “la gran imitadora” (Peeling et al., 2023; Tudor et al., 2022). Esta enfermedad ha afectado a diversas poblaciones en riesgo a lo largo del tiempo y, aunque se consideró casi erradicada en 1998, su incidencia ha ido en aumento desde el año 2000 (Mercuri et al., 2022).

Se recomienda realizar pruebas para diferenciar VHS-1 de VHS-2, ya que esto influye en el pronóstico y en el manejo del paciente. Los CDC aconsejan confirmar el diagnóstico clínico mediante pruebas virológicas y serológicas específicas por tipo (Cole, 2020). Un método eficaz para el diagnóstico de infecciones genitales agudas por VHS en laboratorio es la detección de ADN de VHS-1 y VHS-2 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Cole, 2020). En cuanto a *T. pallidum*, se han estado utilizando en los laboratorios de diagnóstico tanto la detección directa como los tests serológicos debido a que este patógeno no puede ser crecido en cultivo (Forrestel et al., 2020). No obstante, las pruebas serológicas no pueden diferenciar la sífilis de otras infecciones por treponemas debido a la gran similitud genética entre estas bacterias (Forrestel et al., 2020). Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, como la PCR, permiten detectar el ADN bacteriano en muestras clínicas en las primeras fases de la enfermedad, lo que representa una estrategia prometedora para el control de la epidemia de sífilis debido a su alta sensibilidad (Peeling et al., 2023).

### 3. Procedimiento

VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System está diseñado para la detección cualitativa y simultánea de DNA de virus herpes simple tipo 1 (VHS-1), virus herpes siempre tipo 2 (VHS-2) y/o *Treponema pallidum* (Sífilis) en muestras de hisopos de lesiones cutáneas anogenitales y orales. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de VHS-1, VHS-2 y *T. pallidum* se realiza mediante la amplificación de una región conservada del gen *glicoproteína L UL1* de VHS-1, *glicoproteína G US4* de VHS-2, y *16S rRNA* de *T. pallidum*, usando cebadores específicos y sondas marcadas con fluorescencia.

VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System utiliza la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en el equipo BD MAX™.

VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System contiene en cada tubo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado<sup>1</sup>, así como un control interno endógeno (CIE) (el gen *RNAse P* humano) para controlar la integridad de la muestra, el proceso de extracción y/o descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Los genes humanos *housekeeping* están involucrados en el mantenimiento celular básico y, por lo tanto, se espera que estén presentes en todas las células humanas nucleadas y mantengan niveles de expresión relativamente constantes.

Diana	Canal	Gen
VHS-1	475/520	<i>glicoproteína L UL1</i>
VHS-2	530/565	<i>glicoproteína G US4</i>
<i>T. pallidum</i>	630/665	<i>16S rRNA</i>
Control Interno Endógeno (CIE)	585/630	<i>RNAse P</i>

Tabla 1. Diana, canal y genes.

#### 4. Reactivos suministrados

VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 2:

Reactivo/Material	Descripción	Rango de concentración	Código	Cantidad
<i>HSV-1, HSV-2 &amp; Treponema pallidum</i> reaction tube	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Sellado 1E	2 sobres de 12 tubos transparentes
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0.2-1 nMol/µL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer tube	Mezcla de solución salina	±13 mM	Sellado 11	1 sobre de 24 tubos transparentes
	Tampon (TRIS, pH)	±67 mM		

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System con Cat. N°. 444222.

\* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

<sup>1</sup> Tenga en cuenta que los términos "estabilizado" y "lioafilizado" se utilizan de manera indistinguible y como sinónimos en todo el documento.

## 5. Reactivos y equipos a suministrar por el usuario

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

- Equipo de PCR a tiempo real: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref: 442827 o 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vórtex.
- Micropipetas (entre 2 y 1000 µL).
- Agua libre de nucleasas.
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

Opcional:

- Materiales de control externo pueden utilizarse como parte del procedimiento de control de calidad del rendimiento del ensayo. Como control positivo externo (CPE) o control negativo externo (CNE) se puede utilizar material de control disponible en el mercado y/o muestras previamente caracterizadas como positivas o negativas, respectivamente. La selección y validación de los controles CPE y CNE debe realizarse de acuerdo con la normativa local, estatal y/o federal aplicable y los procedimientos estándar de Control de Calidad del laboratorio. Además, cuando se utilice material de control disponible en el mercado, el usuario deberá seguir las instrucciones de uso correspondientes.

## 6. Condiciones de transporte, almacenamiento y uso

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-30°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit.
- Evitar vibraciones durante el transporte para evitar la fuga de líquidos.
- El kit puede usarse hasta 28 días a 2-30°C después de abrir las bolsas de aluminio que contienen los tubos de reacción. Mantener el vial alejado de la luz.

La siguiente tabla resume las condiciones de transporte, almacenamiento y uso tanto para el kit completo como para cada componente:

Componente	Condiciones de transporte	Condiciones de almacenamiento	Condiciones "en-uso"
Kit completo VIASURE <i>HSV-1, HSV-2 &amp; Treponema pallidum</i> Assay for BD MAX™ System		<b>Antes del uso:</b> 2-30°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	* Ver condiciones "en uso" de cada componente.
<i>HSV-1, HSV-2 &amp; Treponema pallidum</i> reaction tube (sellado 1E)	2-30°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	<b>Antes del uso:</b> 2-30°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. <b>En un sobre abierto con el gel de slice:</b> 2-30°C hasta 28 días.	Temperatura ambiente.
Rehydration buffer tube		<b>Antes del uso:</b> 2-30°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. <b>En un sobre abierto con el gel de slice:</b> 2-30°C hasta 28 días.	Temperatura ambiente.

Tabla 3. Resumen de las condiciones de transporte, almacenamiento y uso para el producto VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System y cada uno de sus componentes.

## 7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico in vitro.
- Para diagnóstico *in vitro*.
- Las instrucciones de uso del producto VIASURE y el manual de usuario del sistema BD MAX™ se deben leer cuidadosamente antes de utilizar VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. No llevar a cabo el ensayo PCR hasta haber entendido la información sobre procedimientos, precauciones de seguridad y limitaciones descritas en ellas.
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres de aluminio que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los reactivos si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los reactivos.
- No utilizar los reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los reactivos con el cierre zip inmediatamente después de cada uso para proteger la mezcla de reacción de la luz. Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para evitar el deterioro de la etiqueta, no usar el producto cerca de disolventes.

- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Asegurarse de que el tubo de reacción y el tubo de tampón de rehidratación están bien encajados en su sitio durante la preparación de la gradilla del sistema BD MAX™.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay BD MAX™ System, el kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-3, o cualquier otro reactivo adicional que se necesite para realizar el ensayo y el sistema BD MAX™ no estén contaminados. Evite en todo momento la contaminación microbiológica o con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles, desechables, libres de RNasa/DNasa, y de barrera para aerosoles o de desplazamiento positivo. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos y las tarjetas de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Para evitar la contaminación del medio ambiente por amplicones, no rompa las tarjetas de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge) después de usarlo. Los sellos de las tarjetas de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge) están diseñados para evitar la contaminación.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar o aplicar productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o biopeligrosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras, y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, el transporte, almacenamiento, manipulación y eliminación de muestras.
- Las muestras y los reactivos deben ser manejados en una cabina de seguridad biológica. Utilice equipo de protección personal (PPE) de acuerdo con las directrices actuales para la manipulación de muestras potencialmente infecciosas. Deseche los residuos de acuerdo con las regulaciones locales y estatales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- De conformidad con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (REACH), VIASURE Assays for BD MAX™ System no requieren ficha de datos de seguridad, debido a que se clasifican como no peligrosos para la salud y el medio ambiente por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (CLP), o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración. Se puede solicitar

a Certest Biotec S.L. una declaración en la que se afirme el no requerimiento de la ficha de datos de seguridad.

- Asegurarse de que la programación de la prueba PCR en el sistema BD MAX™ se realiza siguiendo las instrucciones de la sección 'Protocolo PCR' (Parámetros de extracción de muestras, códigos de barras personalizados, configuración PCR, etc.).
- Consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener información sobre advertencias, precauciones y procedimientos adicionales.
- El certificado de análisis no se incluye con este producto, sin embargo, se puede descargar de la web de Certest Biotec S.L. ([www.certest.es](http://www.certest.es)) en caso de necesidad.

## 8. Procedimiento del test

### 8.1. Recogida, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System ha sido testado en muestras de hisopos de lesiones cutáneas anogenitales y orales recogidas con Copan ESwab® (Copan's Liquid Amies Elution Swab) (en lo sucesivo, muestras naturales de lesiones cutáneas). Otros tipos de muestras deben ser validadas por el usuario.

Para la recogida, el almacenaje y el transporte de las muestras deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. En general, las muestras clínicas se deben recoger y etiquetar adecuadamente en contenedores limpios con o sin medio de transporte (dependiendo del tipo de muestra). Despues de la recolección, las muestras deben colocarse en una bolsa de riesgo biológico y deben transportarse y procesarse lo antes posible para garantizar la calidad de la prueba. Las muestras pueden ser transportadas a Temperatura Ambiente (TA) o a  $2\pm2^{\circ}\text{C}$  hasta 48 horas, siguiendo las normativas locales y nacionales para el transporte de material patógeno. Para transporte a largo plazo, se recomienda realizar el envío a  $-20^{\circ}\text{C}$  o menos<sup>2</sup>. Las muestras destinadas a pruebas moleculares deben almacenarse en condiciones controladas para que los ácidos nucleicos no se degraden durante el almacenamiento. Se recomienda utilizar muestras frescas para la prueba, pero en caso de que esto no sea posible o en el caso de un estudio retrospectivo, las muestras deben almacenarse preferentemente a  $-70$  o  $-80^{\circ}\text{C}$  y, como segunda opción, a  $-20^{\circ}\text{C}$ <sup>3</sup>.

Las muestras clínicas deben ser recogidas, transportadas y almacenadas de acuerdo con las guías de laboratorio apropiadas y/o con los manuales de políticas de laboratorio. Como ejemplo, consulte la guía IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology

<sup>2</sup> IDSA guideline (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))

<sup>3</sup> 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.* (English ed.) 37, 127–134 (2019).

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) o 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 Infect. y Microbiol. Clin.* (English ed.) 37, 127–134 (2019).

Nota: las condiciones de recogida, transporte y almacenamiento de muestras indicadas anteriormente se sugieren en base a las recomendaciones para muestras del tracto genitourinario destinadas a ser utilizadas para la detección de ácidos nucleicos, tal como aparecen en las guías de referencia mencionadas anteriormente. Sin embargo, recomendamos seguir las pautas del laboratorio y/o el manual de políticas del laboratorio de microbiología para el transporte y la conservación adecuados de las muestras.

Se llevó a cabo un estudio interno de estabilidad de muestras con VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System utilizando una matriz natural negativa de lesión cutánea enriquecida con las cepas: virus herpes simple tipo 1, cepa KOS (ATCC® VR-1493 Ref. FR-310 (IRR)), virus herpes simple tipo 2, cepa MS (Ref. 0810006CF, Zeptometrix) y *Treponema pallidum*, cepa SS14 (Universidad de Washington), a una concentración de 3xLoD. La estabilidad se analizó mediante tres ensayos diferentes: estabilidad de la muestra primaria anidada con estabilidad en el SBT a 2±2°C y 25±2°C, estabilidad de la muestra primaria a -20±2°C y ciclos de congelación (-80°C) – descongelación (25°C). Los resultados mostraron un buen rendimiento de las muestras almacenadas en todas las condiciones evaluadas. En conclusión, en lo que respecta a la estabilidad de las muestras primarias, las muestras de hisopos de lesiones cutáneas son estables tras 48 horas a 2±2°C y 25±2°C. En cuanto a la estabilidad en el SBT, las muestras son estables tras 7 días en el SBT a 2±2°C y 25±2°C (habiendo pasado hasta 48h a 2±2°C y 25±2°C antes de añadirlas al SBT). Además, las muestras son estables tras 6 meses de almacenamiento a -20±2°C y durante al menos 5 ciclos de congelación-descongelación.

## 8.2. Preparación de la muestra y extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra según las recomendaciones del fabricante, detalladas en el instructivo del kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-3.

1. Pipetear 500 µL de muestra en un tubo de tampón de muestras del sistema BD MAX™ (BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube) y cerrar el tubo con el tapón perforable. Asegurar que se mezcla completamente agitando la muestra en vórtex a alta velocidad durante 1 minuto. Proceder con BD MAX™ System Operation.

Nota: Asegúrese de agitar en vórtex unos minutos antes de iniciar el ensayo. Si se utiliza el mismo tubo BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube para repetir la prueba, se recomienda agitar manualmente

el tubo unos minutos antes de iniciar la prueba para garantizar la correcta homogeneización de la muestra.

Nota: La aplicación de procedimientos de extracción específicos debe ser desarrollada y validada por el usuario y otro tipo de muestras pueden requerir una etapa de tratamiento previo.

### 8.3. Protocolo PCR

Nota: Por favor, consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener instrucciones más detalladas.

#### 8.3.1. Programación del test VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay BD MAX™ System

Nota: Si ya ha creado el test para VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, puede omitir el paso 8.3.1 e ir directamente al 8.3.2.

- 1) En la pantalla “Run” (Correr) del Sistema BD MAX™, seleccionar la pestaña “Test Editor” (Editor del test).
- 2) Hacer click en el botón “Create” (Crear).

En la pestaña “Basic information” (Información básica):

- 3) En el campo “Test Name” (Nombre del test), escribir el nombre del test: ej. VIASURE HHT.  
Note: El nombre del test debe ser único y tener un máximo de veinte caracteres.
- 4) En el menú desplegable “Extraction Type” (Tipo de extracción), seleccionar “ExK TNA-3”.
- 5) En el menú desplegable “Master Mix Format” (Formato master mix), elegir “Type 5: Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer” (Tipo 5: MM liofilizada concentrada con tampón de rehidratación).
- 6) En el campo “Sample extraction parameters” (Parámetros de extracción de muestra) seleccionar “User defined” (Definido por usuario) y ajustar los siguientes valores de los parámetros (tabla 4).

<i>Sample Extraction Parameters</i> (Parámetros de extracción de muestra)	<i>Value (units)</i> [Valor (unidades)]
<i>Lysis Heat Time</i> (Tiempo de lisis por calor)	15 (min)
<i>Lysis Temperature</i> (Temperatura de lisis)	55 (°C)
<i>Sample Tip Height</i> (Altura de la punta de la muestra)	1600 (steps)
<i>Sample Volume</i> (Volumen de muestra)	475 (µL)
<i>Wash Volume</i> (Volumen de lavado)	500 (µL)

<i>Neutralization Volume</i> (Volumen de neutralización)	N/A
<i>DNase Heat Time</i> (Temperatura de calentamiento de DNasa)	N/A

Tabla 4. Parámetros de la extracción de muestras realizada con BD MAX™ ExK™ TNA-3.

- 7) En el campo “Ct Calculation” (Cálculo Ct) seleccionar “Call Ct at Threshold Crossing” (Análisis de Ct con cruce del umbral) (seleccionado por defecto).
- 8) Si se está ejecutando la versión de software 5.00 o superior y se tienen tubos con sellado con código de barras, en el campo “Custom Barcodes” (Códigos de barras personalizados) seleccionar la siguiente configuración:
  - a. “Snap-In 2 Barcode”: 1E (en relación a *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* reaction tube)
  - b. “Snap-In 3 Barcode”: 11 (en relación a Rehydration Buffer tube).

En la pestaña “PCR Settings” (Configuración PCR):

- 9) En el campo “PCR Settings” (Configuración PCR) introducir los siguientes parámetros descritos en la tabla 5: “Alias” (hasta siete caracteres alfanuméricos), “PCR Gain” (Ganancia) y “Threshold” (Umbral), “Ct Min” (Ct mínimo) y “Ct Max” (Ct máximo).

<i>Channel</i> (Canal)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Gain</i> (Ganancia)	<i>Threshold</i> (Umbral)	<i>Ct Min</i> (Ct Min)	<i>Ct Max</i> (Ct Max)
475/520 (FAM)	VHS1	40	200	0	40
530/565 (HEX)	VHS2	60	200	0	40
585/630 (ROX)	CIE	40	200	0	40
630/665 (Cy5)	TRE	60	200	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabla 5. PCR settings (Configuración PCR).

Nota: Se recomienda establecer como valor mínimo de partida de *threshold* los indicados anteriormente para cada canal. Sin embargo, el usuario final debe ajustar los valores de *threshold* finales durante la interpretación del resultado para garantizar que el *threshold* se sitúe dentro de la fase exponencial de las curvas de amplificación y por encima de cualquier señal de ruido de fondo. El valor de *threshold* puede variar entre distintos instrumentos debido a las diferentes intensidades de señal.

- 10) En el campo “Color compensation” (Compensación de color) introducir los siguientes parámetros (Tabla 6).

		<i>False Receiving Channel</i> (Canal de falsa recepción)					
		<i>Channel</i> (Canal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
<i>Excitation Channel</i> (Canal de excitación)	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	-	

Tabla 6. Parámetros “Color compensation” (Compensación de color).

En la pestaña “Melt Settings” (Configuración Melt) no es necesaria ninguna acción, no aplica a este producto.

En la pestaña “Test Steps” (Etapas del test):

- 11) Para definir cada etapa del protocolo de PCR, introducir el nombre de la etapa (hasta veinte caracteres) y configurar los siguientes parámetros: “Profile Type” (Tipo de perfil), “Cycles” (Ciclos), “Time” (Tiempo) and “Temperature” (Temperatura) y seleccionar el campo “Detect” (Detectar) para definir la etapa en la que se realiza la detección (Tabla 7). Hacer clic en el botón "Añadir" para añadir una nueva etapa y repetir el proceso hasta definir todas las etapas necesarias.

Nota: el campo “Type” (Tipo) debe estar vacío.

Step (Etapa)	Step name (Nombre de la etapa)	Profile Type (Tipo de perfil)	Cycles (Ciclos)	Time (s) (Tiempo (s))	Temperature (Temperatura)	Detect (Detección)
Initial denaturation (Desnaturalización inicial)	IN-denaturation	Hold (Choque térmico)	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Desnaturalización y alineamiento/extensión (recogida de datos))	Annealing/Extension	2-Temperature ( 2-Temperaturas)	45	10	95°C	-
				41	63°C	✓

Tabla 7. Protocolo PCR.

En la pestaña “Results logic” (Resultado lógico):

- 12) En el campo “Target” (Diana) introducir el nombre de la diana: ej. VHS1 (hasta siete caracteres). Repetir los pasos 12-15 para cada diana (ej. VHS2 o TRE) siguiendo las tablas específicas para la diana que se va a definir.
- 13) Hacer clic en la casilla de verificación “Analyze” (Analizar) para incluir las longitudes de onda (canales PCR) deseadas en el análisis de resultados de la diana (Tablas 8-10).

Wavelength (Longitud de onda)	Alias (Alias)	Type (Tipo)	Analyze (Analizar)
475/520	VHS1	PCR	✓
585/630	CIE	PCR	✓

Tabla 8. Selección de los canales de PCR en la pestaña “Result logic” (Resultado lógico) para la diana VHS1 (Virus herpes simple 1).

Wavelength (Longitud de onda)	Alias (Alias)	Type (Tipo)	Analyze (Analizar)
530/565	VHS2	PCR	✓
585/630	CIE	PCR	✓

Tabla 9. Selección de los canales de PCR en la pestaña “Result logic” (Resultado lógico) para la diana VHS2 (Virus herpes simple 2).

Wavelength (Longitud de onda)	Alias (Alias)	Type (Tipo)	Analyze (Analizar)
585/630	CIE	PCR	✓
630/665	TRE	PCR	✓

Tabla 10. Selección de los canales de PCR en la pestaña “Result logic” (Resultado lógico) para la diana TRE (*Treponema pallidum*).

14) Hacer clic en el botón “Edit Logic” (Editar lógica).

15) En la ventana “Edit logic” (Editar lógica) aparecen todas las combinaciones de resultados. Para cada fila, en el menú desplegable “Result” (Resultado), seleccionar el resultado llamado cuando se cumplen las condiciones de esa fila, siguiendo las tablas 11-13.

Result (Resultado)	VHS1 (475/520)	CIE (585/630)
POS	Valid	Valid
UNR	Valid	Invalid
NEG	Invalid	Valid
UNR	Invalid	Invalid

Tabla 11. Lista de combinaciones de resultados y resultado lógico para la diana VHS1 (Virus herpes simple 1). Los resultados disponibles son POS (Positivo), NEG (negativo) y UNR (no resuelto).

Result (Resultado)	VHS2 (530/565)	CIE (585/630)
POS	Valid	Valid
UNR	Valid	Invalid
NEG	Invalid	Valid
UNR	Invalid	Invalid

Tabla 12. Lista de combinaciones de resultados y resultado lógico para la diana VHS2 (Virus herpes simple 2). Los resultados disponibles son POS (Positivo), NEG (negativo) y UNR (no resuelto).

Result (Resultado)	TRE (630/665)	CIE (585/630)
POS	Valid	Valid
UNR	Valid	Invalid
NEG	Invalid	Valid
UNR	Invalid	Invalid

Tabla 13. Lista de combinaciones de resultados y resultado lógico para la diana TRE (*Treponema pallidum*). Los resultados disponibles son POS (Positivo), NEG (negativo) y UNR (no resuelto).

Nota: Según el Ct Max definido previamente (Tabla 5), el resultado de los canales VHS1 (475/520), VHS2 (530/565), EIC (585/630) y TRE (630/665) se considera “Valid” (Valido) si el valor de Ct obtenido es ≤40; e “Invalid” (Invalido) si el valor de Ct obtenido es >40.

16) Hacer click en el botón “Save Test” (Guardar test).

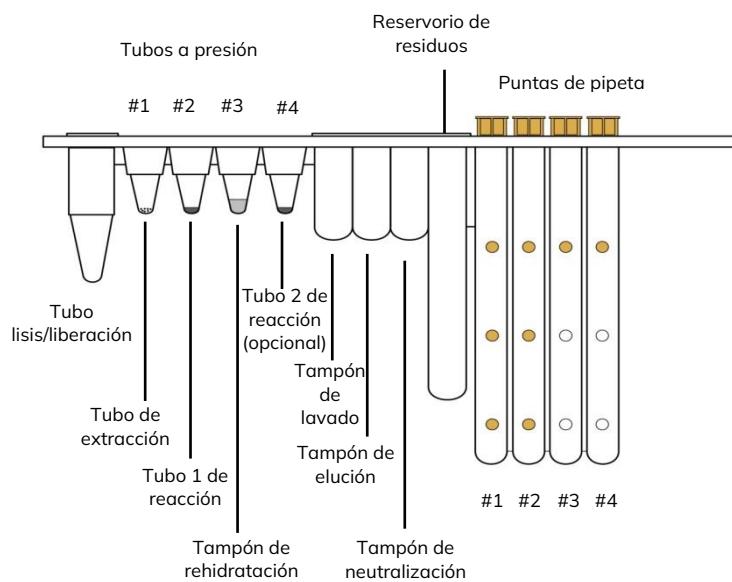
### 8.3.2. Preparación de la gradilla del sistema BD MAX™

- 1) Para cada muestra, coger una tira de reactivos individual del kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos y colocar la tira de reactivos en la gradilla del sistema BD MAX™.
- 2) Determinar y separar el número de tubos de reactivo de extracción necesarios (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (sello blanco)) de su bolsa protectora. Colocar (presionar hasta escuchar

un click) el tubo de reactivo de extracción (sello blanco) en su posición correspondiente dentro de la tira de reactivos TNA (Posición 1. Código de color blanco en la gradilla. Ver Figura 1). Eliminar el exceso de aire, y cerrar las bolsas protectoras con el zip.

- 3) Calcular y separar el número adecuado de *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* reaction tube (sello 1E) y colocarlos (presionar hasta escuchar un click) en su posición correspondiente de la tira (Posición 2. Código de color verde en la gradilla. Ver Figura 1).
  - a. Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres de aluminio con el zip.
  - b. Para llevar a cabo una rehidratación correcta, asegurarse que el producto liofilizado esté en la parte inferior del tubo y que no esté adherido al área superior del tubo o del sellado del tubo. Golpear suavemente cada tubo sobre una superficie dura para asegurarse de que todo el producto quede en el fondo del tubo.
- 4) Coger el número necesario de Rehydration Buffer tubes (sello 11) y colocarlos en su posición correspondiente dentro de la tira (Posición 3. Sin código de color en la gradilla. Ver Figura 1).
  - a. Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres con el zip.
  - b. Para llevar a cabo una transferencia correcta, asegúrese de que el líquido esté en la parte inferior del tubo y que no esté adherido a la parte superior del tubo o al sello del mismo. Golpear suavemente cada tubo sobre una superficie dura para asegurarse de que todo el producto quede en el fondo del tubo.

Figura 1. Tira de reactivos individuales BD MAX™ TNA Reagent (TNA) del kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



### 8.3.3. Configuración del instrumento BD MAX™

- 1) Seleccionar la pestaña “Work List” (Lista de trabajo) en la pantalla “Run” (Correr) utilizando el software v4.50A o uno superior del sistema BD MAX™.
- 2) En el menú desplegable “Test” (Test), seleccionar VIASURE HHT (si todavía no está creado, consultar la sección 8.3.1).

- 3) Seleccionar en el menú desplegable “Kit Lot Number” (Número de lote del kit) el número de lote del kit de extracción empleado (situado en el estuche exterior). Este paso es opcional.  
Nota: Los números de lote deben definirse en la pantalla “Inventory” (Inventario) antes de poder seleccionarlos aquí.
- 4) Introducir el número de identificación/el código de barras del “Sample Buffer Tube” (Tubo de tampón de muestra) en el campo de “Sample tube” (Tubo de muestra), ya sea escaneando el código de barras con el lector o mediante entrada manual.
- 5) Introducir “Specimen/Patient ID” (identificación de la muestra/paciente) y/o “Accession” (Acceso) y pulsar la tecla “Tab” o “Enter”. Continuar hasta que se introduzcan todos los tubos de tampón de muestra. Asegurar que la identificación muestra/paciente y los tubos de tampón de muestra están correctamente colocados.
- 6) Colocar el tampón de muestra preparado en la(s) gradilla(s) del sistema BD MAX™.
- 7) Colocar la(s) gradilla(s) en el sistema BD MAX™ (la gradilla A se encuentra en el lado izquierdo del sistema BD MAX™ y la gradilla B en el lado derecho).
- 8) Colocar el número necesario de BD MAX™ PCR Cartridges en el sistema BD MAX™.
- 9) Cerrar la puerta del sistema BD MAX™.
- 10) Presionar “Start Run” (Empezar a correr) para comenzar con el procedimiento.

#### 8.3.4. Informe BD MAX™

- 1) En el menú principal, hacer clic en el botón “Results” (Resultados).
- 2) Hacer doble clic en la prueba incluida en la lista de ensayos o seleccionar la prueba y presionar el botón “view” (Ver).
- 3) Se activarán los botones “Print” (Imprimir) y “Export” (Exportar) en la parte inferior de la pantalla.

Para imprimir los resultados:

1. Hacer clic en el botón “Print”.
2. En la ventana de vista previa de impresión del informe de resultados seleccionar: “Run Details, Test Details and Plot...” (Detalles de ejecución, detalles de prueba y gráfica ...).
3. Hacer clic en “Print” para imprimir el informe o en “Export” para exportar el informe en PDF a un USB.

Para exportar los resultados:

1. Hacer clic en el botón “Export” para transferir el informe (archivo PDF y CSV) a un USB.
2. Una vez finalizada la exportación, aparecerá un ícono de correcto/incorrecto en la ventana “Results Export” (Exportación de resultados).

## 9. Interpretación de resultados

Para una descripción detallada de cómo analizar los datos, consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™.

El análisis de los datos se realiza con el software del sistema BD MAX™ de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. El software del sistema BD MAX™ proporciona los valores de Ct y muestra las curvas de amplificación para cada uno de los canales de detección de cada muestra que se analiza de la siguiente manera:

- Un valor de Ct de 0 indica que el software no ha calculado ningún valor de Ct con el umbral especificado (ver Tabla 5). Si la curva de amplificación muestra un “0” como valor de Ct, es necesario analizarla manualmente.
- Un valor de Ct de -1 indica que no ha habido proceso de amplificación, que el software no ha calculado ningún valor de Ct o que el valor de Ct calculado está por debajo del umbral especificado o por encima por encima del Ct Max (Cut-off) establecido.
- Cualquier otro valor de Ct debería de ser interpretado en correlación con la curva de amplificación y según el resultado lógico definido, siguiendo las pautas de interpretación descritas en la Tabla 14.

Comprobar la emisión de la señal del control interno endógeno (CIE) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. Además, comprobar que no hay ningún fallo del sistema BD MAX™.

Los resultados deben leerse y analizarse utilizando la siguiente tabla:

VHS-1 (Nombre de la diana: VHS1)	VHS-2 (Nombre de la diana: VHS2)	<i>T. pallidum</i> (Nombre de la diana: TRE)	Interpretación de muestras individuales de pacientes
POS	POS	POS	DNA de VHS-1, VHS-2 y <i>T. pallidum</i> Detectado
POS	POS	NEG	DNA de VHS-1 y VHS-2 Detectado, DNA de <i>T. pallidum</i> No Detectado
POS	NEG	POS	DNA de VHS-1 y <i>T. pallidum</i> Detectado, DNA de VHS-2 No Detectado
NEG	POS	POS	DNA de VHS-2 y <i>T. pallidum</i> Detectado, DNA de VHS-1 No Detectado
POS	NEG	NEG	DNA de VHS-1 Detectado, DNA de VHS-2 y <i>T. pallidum</i> No Detectado
NEG	POS	NEG	DNA de VHS-2 Detectado, DNA de VHS-1 y <i>T. pallidum</i> No Detectado
NEG	NEG	POS	DNA de <i>T. pallidum</i> Detectado y DNA de VHS-1 y VHS-2 No detectado
NEG	NEG	NEG	DNA de VHS-1, VHS-2 y <i>T. pallidum</i> No detectado

UNR	UNR	UNR	Resultado no resuelto (UNR) debido a la presencia de inhibidores en la reacción de PCR o a un problema general (no informado por un código de error) durante el procesamiento de la muestra y/o la etapa de amplificación. <sup>1</sup>
IND	IND	IND	Resultado indeterminado (IND) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de un fallo del instrumento vinculado a un código de error. <sup>2</sup>
INC	INC	INC	Resultado de ensayo incompleto (INC) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de que no se complete la prueba. <sup>2</sup>

Tabla 14. Interpretación de muestras.

**1** El control interno endógeno (CIE) debe mostrar una señal de amplificación con valor de  $Ct \leq 40$ . Si no hay señal de amplificación del CIE o el valor de  $Ct$  es  $> 40$ , el resultado se considera No resuelto (UNR) y es necesario repetir la prueba. Se recomienda repetir el ensayo a partir del mismo tubo Sample Buffer Tube (SBT), a partir de la misma muestra preparando un nuevo SBT o a partir de una nueva muestra (más concentrada si es posible). También puede ocurrir que el resultado No Resuelto (UNR) se deba a la presencia de inhibidores en la reacción de PCR. En estos casos, se recomienda diluir estas muestras 1/10.

NOTA: Las muestras naturales de lesión cutánea pueden conservarse sin transferir al SBT durante un máximo de 48 horas si se almacenan a  $2\pm2^{\circ}\text{C}$  -  $25\pm2^{\circ}\text{C}$  (expresado en ESwab® de Copan). En caso de repetir el análisis desde el mismo SBT, se recomienda agitar manualmente el tubo para garantizar la correcta homogeneización de la muestra. Las muestras naturales de lesión cutánea pueden conservarse en el SBT hasta 7 días a  $2\pm2^{\circ}\text{C}$  -  $25\pm2^{\circ}\text{C}$ .

**2** Pueden obtenerse resultados indeterminados (IND) o incompletos (INC) debido a un fallo del sistema y es necesario volver a realizar la prueba. Consulte el Manual del usuario del sistema BD MAX™ para la interpretación de los códigos de advertencia y error.

Nota: Cuando se utilicen controles externos, estos deben mostrar los siguientes resultados esperados: negativo para ENC y positivo para EPC (se espera que las muestras positivas conocidas sean positivas solo para el microorganismo o microorganismos presentes en la muestra). Un ENC con resultado positivo es indicativo de contaminación o fallo en la manipulación de la muestra. Un EPC con resultado negativo es indicativo de un problema de manipulación/preparación de la muestra. Revisar la técnica de preparación/manipulación de la muestra. Cuando se produce un fallo del control externo es necesario repetir la prueba.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario; verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la PCR y revisar los parámetros; y verificar la forma sigma de la curva y la intensidad de la fluorescencia.

El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

## 10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con muestras de hisopos de lesiones cutáneas anogenitales y orales.
- Para obtener un buen rendimiento de la prueba, el producto liofilizado debe encontrarse en la parte inferior del tubo y no adherido a la parte superior del tubo o al sello de aluminio. Golpear suavemente cada tubo sobre una superficie dura para asegurarse de que todo el producto quede en el fondo del tubo.
- Es posible observar fenómenos “crosstalk” en canales vacíos del sistema BD MAX™ si no hay diana que detectar, por lo que es necesario seleccionar solo los canales donde éstas amplifiquen cuando se lleve a cabo la interpretación de resultados. Para cualquier consulta contacte con [viasuresupport@certest.es](mailto:viasuresupport@certest.es).
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. No es posible correlacionar los valores Ct obtenidos en la PCR con la concentración de la muestra, ya que éstos dependen del termociclador utilizado y de la propia ejecución.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Tenga en cuenta el rango de medición previsto del ensayo, ya que las muestras con concentraciones por encima o por debajo de este rango pueden dar resultados erróneos.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con muestras sospechosas de VHS-1, VHS-2 y/o *T. pallidum*, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana, o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Las combinaciones de cebadores y sondas específicas para la detección del gen del gen *glicoproteína L UL1* de VHS-1, *glicoproteína G US4* de VHS-2, y *16S rRNA* de *T. pallidum*, empleada en el test VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, no mostraron homologías combinadas significativas con el genoma humano, microflora humana u otros microorganismos, que pudieran originar falsos positivos predecibles.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:
  - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
  - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de DNA).
  - Degradación del DNA durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
  - Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de nuevas o desconocidas cepas de VHS-1, VHS-2 y/o *T. pallidum*.

- Una carga microbiana en la muestra por debajo del límite de detección del ensayo.
  - La presencia de inhibidores de qPCR u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de las vacunas, de algunas terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos, fármacos inmunosupresores o antifúngicos utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de esta.
  - El efecto de sustancias interferentes solo se ha evaluado para aquellas indicadas en la sección 12.5.1 (estudio de sustancias interferentes) de estas instrucciones de uso. Por favor, consulte dicha sección para comprobar las sustancias exógenas y endógenas más comunes que inducen una interferencia total o parcial de la reacción qPCR. Otras sustancias no indicadas en este apartado pueden dar lugar a resultados erróneos.
  - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables y no implica que estos microorganismos sean infecciosos o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias diana de VHS-1, VHS-2 y/o *T. pallidum*.
  - Resultados negativos no excluyen la presencia de DNA de VHS-1, VHS-2 y/o *T. pallidum* en una muestra clínica y no deben usarse como la única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. No se han determinado los tipos de muestras óptimos y el momento en el que se alcanzan los máximos niveles de carga microbiana durante las infecciones causadas por VHS-1, VHS-2 y/o *T. pallidum*. La recogida de múltiples muestras (tipos de muestras y en varios puntos a lo largo del tiempo) del mismo paciente puede ser necesaria para detectar el patógeno.
  - Si las pruebas de diagnóstico para otras enfermedades de transmisión sexual (ETS) son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por VHS-1, VHS-2 y/o *T. pallidum*, entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.
  - Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como: equipo de PCR utilizado (incluso siendo el mismo modelo), sistema de extracción, tipo de muestra, tratamiento previo de la muestra etc.... entre otros.
  - Los valores predictivos positivo y negativo dependen en gran medida de la prevalencia en todas las pruebas de diagnóstico in vitro. El rendimiento de VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System puede variar en función de la prevalencia y de la población analizada.
  - En el caso de obtener con VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System resultados no resueltos, indeterminados o incompletos, se requiere volver a testar de nuevo. Los resultados no resueltos pueden deberse a la presencia de inhibidores en la muestra o debido a una rehidratación incorrecta del tubo de mezcla de reacción liofilizada. Si hay un fallo en el instrumento, se podrán obtener resultados indeterminados o incompletos.

## 11. Control de calidad

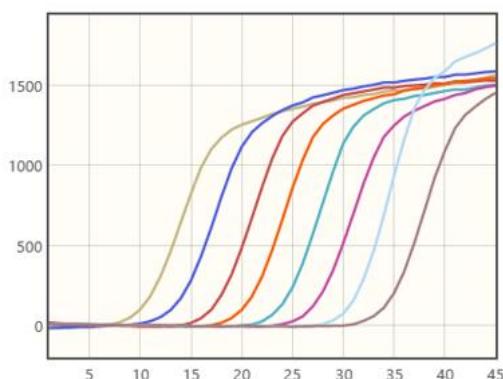
VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System contiene un Control Interno Endógeno (CIE) en cada tubo de reacción que confirma el correcto funcionamiento de la técnica. Además, la utilización de controles externos (EPC y ENC) permite confirmar el rendimiento del ensayo. El sistema BD MAX™ no utiliza los controles externos para la interpretación de resultados sino que los considera como una muestra. El Control Positivo Externo (EPC) está destinado a controlar un posible fallo de los reactivos del ensayo, mientras que el Control Negativo Externo (ENC) está destinado a detectar la contaminación ambiental o de los reactivos por los ácidos nucleicos diana.

## 12. Características analíticas del funcionamiento del test

### 12.1. Linealidad analítica

La linealidad del ensayo se determinó y confirmó analizando diluciones seriadas 1:10 de muestras de matriz artificial de lesión cutánea<sup>4</sup> (Artificial Matrix for Cutaneous Lesion, Biochemazone BZ394) con una concentración conocida (en el rango de 2E+07 a 2E+01 copias/μL) de DNA específico y sintético de HSV-1, HSV-2 y *T. pallidum*. A continuación, se incluye un ejemplo de la gráfica de amplificación resultante:

Figura 2. Diluciones seriadas de VHS-1 (2E+07 a 2E+01 copias/μL). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).



<sup>4</sup> Debido a la disponibilidad limitada de muestras de hisopos de lesiones cutáneas anogenitales y orales, se realizó un estudio de equivalencia de matriz natural frente a matriz artificial para confirmar que la matriz artificial podía utilizarse en los ensayos de validación. Por lo tanto, se testaron las matrices natural y artificial confirmando que eran equivalentes.

Figura 3. Diluciones seriadas de VHS-2 (2E+07 a 2E+01 copias/ $\mu$ L). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 530/565 (HEX)).

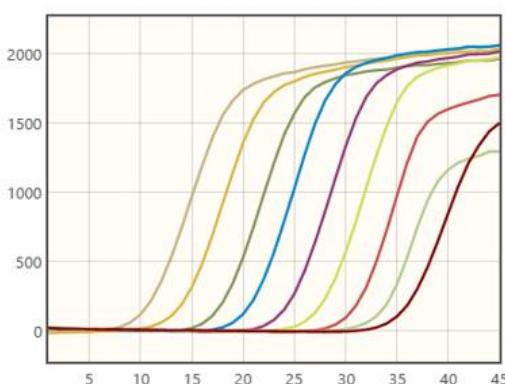
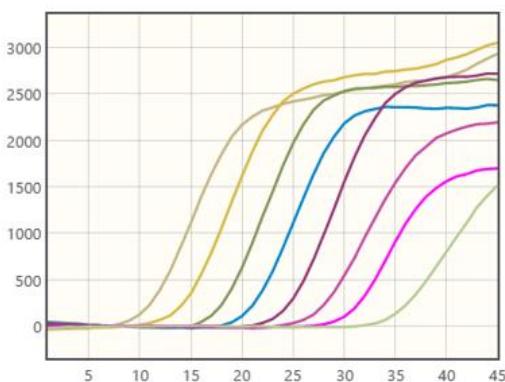


Figura 4. Diluciones seriadas de *T. pallidum* (2E+07 a 2E+01 copias/ $\mu$ L). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 630/665 (Cy5)).



## 12.2. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica normalmente suele hacer referencia al Límite de Detección (LoD). En la práctica, los parámetros de LoD y Límite de Blanco (LoB) se establecen como parte de la evaluación de la sensibilidad analítica.

### 12.2.1. Límite de Blanco (LoB)

Para la determinación del “límite de blanco” (LoB), se realizó un ensayo de control sin muestra utilizando tres lotes de VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System y 24 réplicas de tres tipos de muestras: muestras naturales negativas de lesiones cutáneas, matriz negativa artificial de lesión cutánea y agua libre de RNasa/DNasa.

Se verificó la ausencia de señal en los canales FAM, HEX y Cy5, así como la presencia de señal para el Control Interno Endógeno (CIE) en el canal ROX en el caso de la matriz negativa (matriz de lesión cutánea natural o simulada). En conclusión, los resultados obtenidos confirmaron que el producto no genera amplificaciones inespecíficas en las diferentes matrices evaluadas.

## 12.2.2. Límite de Detección (LoD)

El límite de detección (LoD) de VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System fue analizado con tres lotes utilizando muestras naturales de lesiones cutáneas. Se utilizaron las cepas de referencia de virus herpes simple tipo 1, cepa KOS (ATCC® VR-1493 Ref. FR-310 (IRR)), virus herpes simple tipo 2, cepa MS (Ref. 0810006CF, Zeptometrix) y *Treponema pallidum*, cepa SS14 (Universidad de Washington). En conclusión, VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System mostró un LoD de 2,52E+02 TCID50/ml para HSV-1, 6,30E+00 TCID50/ml para HSV-2 y 6,60E+03 células/ml para *T. pallidum*, con una tasa de positividad  $\geq 95\%$ , en muestras de lesiones cutáneas naturales.

## 12.3. Rango de medición

El rango de medición del ensayo se determinó probando una serie de diluciones 1:10 que contenían una concentración conocida de DNA específico perteneciente a HSV-1, HSV-2 y *T. pallidum*. Los resultados permitieron confirmar la correcta detección de la diana en el rango de medición de 2E+07 a 2E+00 copias/ $\mu$ l para HSV-1 y *T. pallidum*, y de 2E+07 a 2E-01 copias/ $\mu$ l para HSV-2.

En conclusión, el rango de medida de VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System fue determinado satisfactoriamente, asegurando la fiabilidad, exactitud y reproducibilidad de los resultados en un amplio espectro de cargas bacterianas/virales, y afirmando su utilidad en varios escenarios de diagnóstico clínico.

## 12.4. Exactitud

### 12.4.1. Veracidad (Sesgo)

La veracidad de VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System fue evaluada frente al material de referencia listado a continuación en matriz de lesión cutánea.

#### 1. Fragmentos de DNA sintéticos

- Fragmento de DNA sintético para el gen *glicoproteína L UL1* de VHS-1: HSV1.XPC, canal FAM.
- Fragmento de DNA sintético para el gen *glicoproteína G US4* de VHS-2: HSV2.XPC, canal HEX.
- Fragmento de DNA sintético para el gen *16S rRNA* de *T. pallidum*: TREXPC, canal Cy5.

Todos los fragmentos de DNA sintéticos se detectaron correctamente en el canal adecuado.

## 2. Colección Americana de Cultivos Tipo (“ATCC®”)

Referencia externa	Microorganismo	Nombre del producto	Variedad	Resultado
VR-1493	Virus herpes simple 1	Human herpesvirus 1	Cepa KOS	Detectado
VR-260	Virus herpes simple 1	Human Herpesvirus 1	Cepa HF	Detectado
VR-539	Virus herpes simple 1	Human Herpesvirus 1	Cepa MacIntyre	Detectado
VR-733	Virus herpes simple 1	Human Herpesvirus 1	Cepa F	Detectado
VR-3393	Virus herpes simple 2	Human Herpesvirus 2	Cepa G	Detectado
VR-1779	Virus herpes simple 2	Human Herpesvirus 2	Cepa ATCC-2011-2	Detectado
BAA-2642SD	<i>Treponema pallidum</i>	Quantitative Synthetic <i>Treponema pallidum</i> DNA	N/A	No detectado

Tabla 15. Material de referencia de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC®).

Todas las cepas de la ATCC se detectaron correctamente en el canal adecuado y el CIE mostró amplificación con un valor  $Ct \leq 40$ , excepto el material “Quantitative Synthetic *Treponema pallidum* DNA” (código ATCC BAA-2642SD). Este DNA sintético incluye fragmentos de los genes *polA*, *23S*, *16S*, *flaA*, *proteína 47kDa* y *bmp*, sin embargo, la ausencia de detección a muy alta concentración (hasta 4,70E+04 copias/ $\mu$ l) utilizando el ensayo VIASURE sugiere que su región diana dentro del gen *16S* no está incluida en el DNA sintético de la ATCC. Por lo tanto, no puede utilizarse como material de referencia.

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

Referencia externa	Microorganismo	Nombre del producto	Variedad	Resultado
16/368	Virus herpes simple 1	1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-1 (HSV-1)	N/A	Detectado
17/122	Virus herpes simple 2	1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-2 (HSV-2)	N/A	Detectado

Tabla 16. Material de referencia de National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC).

Todas las cepas de NIBSC se detectaron correctamente en el canal adecuado y el CIE mostró amplificación con un valor  $Ct \leq 40$ .

## 4. Material de control

Referencia externa	Procedencia	Microorganismo	Nombre del producto	Variedad	Resultado
0810006CF	ZeptoMetrix	Virus herpes simple 2	Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2)	Cepa MS	Detectado
MBC109	Vircell S.L.	<i>Treponema pallidum</i>	AMPLIRUN® TREPONEMA PALLIDUM DNA CONTROL	N/A	Detectado
N/A	Universidad de Washington	<i>Treponema pallidum</i>	Heat-killed <i>Treponema pallidum</i>	Cepa Nichols	Detectado
N/A	Universidad de Washington	<i>Treponema pallidum</i>	Heat-killed <i>Treponema pallidum</i>	Cepa SS14	Detectado

Tabla 17. Material de control para HSV-2 y *T. pallidum* de Vircell S.L., ZeptoMetrix y Universidad de Washington.

Todas las cepas y materiales de referencia se detectaron correctamente en el canal adecuado y el CIE mostró amplificación con un valor Ct ≤40.

### 12.4.2. Precisión

Para determinar la precisión de VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, se realizaron intra-ensayos (repetibilidad), inter-ensayo, inter-lote y ensayos inter-termociclador (reproducibilidad) con matriz artificial de lesión cutánea enriquecida con las cepas de referencia de virus herpes simple tipo 1, cepa KOS (ATCC® VR-1493 Ref. FR-310 (IRR)), virus herpes simple tipo 2, cepa MS (Ref. 0810006CF, Zeptometrix) y *Treponema pallidum*, cepa SS14 (Universidad de Washington).

#### Intra-ensayo

El intra-ensayo se probó analizando seis réplicas de las diferentes muestras en la misma carrera utilizando VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Un resumen de los resultados se muestra en la siguiente tabla.

Diana	Canal	Muestra	Ct ( $\bar{x}$ )	$\sigma$	CV%
HSV-1	475/520 (FAM)	3xLoD	33,32	0,49	1,48
		5xLoD	32,93	0,12	0,37
		Control negativo	NEG	N/A	N/A
HSV-2	530/565 (HEX)	3xLoD	31,08	0,40	1,28
		5xLoD	32,00	0,24	0,74
		Control negativo	NEG	N/A	N/A
EIC	585/630 (ROX)	3xLoD	30,42	0,15	0,48
		5xLoD	29,90	0,48	1,60
		Control negativo	NEG	N/A	N/A
<i>Treponema</i> <i>pallidum</i>	630/665 (Cy5)	3xLoD	34,17	0,55	1,61
		5xLoD	31,95	0,43	1,35
		Control negativo	NEG	N/A	N/A

Tabla 18. Resultados de intra-ensayo de VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = ciclo umbral. ( $\bar{x}$ ) = media aritmética del Ct, ( $\sigma$ ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, NEG = negativo, N/A.= no aplica.

#### Inter-ensayo

El inter-ensayo se probó analizando cuatro réplicas de las diferentes muestras en tres días diferentes por tres operadores distintos con VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Un resumen de los resultados se muestra en la siguiente tabla.

Diana	Canal	Muestra	Ct ( $\bar{x}$ )	$\sigma$	CV%
HSV-1	475/520 (FAM)	3xLoD	33,21	0,47	1,41
		5xLoD	31,85	0,78	2,43
		Control negativo	NEG	N/A	N/A
HSV-2	530/565 (HEX)	3xLoD	33,83	0,56	1,66
		5xLoD	32,68	0,48	1,48
		Control negativo	NEG	N/A	N/A
EIC	585/630 (ROX)	3xLoD	29,82	0,43	1,43
		5xLoD	29,94	0,40	1,33
		Control negativo	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
		Control negativo	NEG	N/A	N/A

Tabla 19. Resultados de inter-ensayo de VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = ciclo umbral. ( $\bar{x}$ ) = media aritmética del Ct, ( $\sigma$ ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, NEG = negativo, N/A.= no aplica.

### Inter-lote

Los valores de inter-lote se determinaron analizando seis réplicas de las diferentes muestras mediante el uso de tres lotes de VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Un resumen de los resultados se muestra en la siguiente tabla.

Diana	Canal	Muestra	Ct ( $\bar{x}$ )	$\sigma$	CV%
HSV-1	475/520 (FAM)	3xLoD	33,26	0,46	1,38
		5xLoD	33,29	0,33	1,00
		Control negativo	NEG	N/A	N/A
HSV-2	530/565 (HEX)	3xLoD	30,98	0,86	2,78
		5xLoD	32,70	0,58	1,79
		Control negativo	NEG	N/A	N/A
EIC	585/630 (ROX)	3xLoD	30,04	0,57	1,89
		5xLoD	30,26	0,56	1,86
		Control negativo	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
		Control negativo	NEG	N/A	N/A

Tabla 20. Resultados de inter-lote de VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = ciclo umbral. ( $\bar{x}$ ) = media aritmética del Ct, ( $\sigma$ ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, NEG = negativo, N/A.= no aplica.

### Inter-termociclador.

Los valores de inter-termociclador fueron determinados con cuatro réplicas de las mismas muestras utilizadas para el intra-ensayo, inter-ensayo y ensayo inter-lote, utilizando VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System y tres sistemas BD MAX™ diferentes. Un resumen de los resultados se muestra en la siguiente tabla.

Diana	Canal	Muestra	Ct ( $\bar{x}$ )	$\sigma$	CV%
HSV-1	475/520 (FAM)	3xLoD	33,71	0,52	1,54
		5xLoD	32,68	0,59	1,79
		Control negativo	NEG	N/A	N/A
HSV-2	530/565 (HEX)	3xLoD	33,56	0,80	2,39
		5xLoD	32,65	0,42	1,28
		Control negativo	NEG	N/A	N/A
EIC	585/630 (ROX)	3xLoD	29,51	0,77	2,59
		5xLoD	29,23	0,39	1,33
		Control negativo	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
		Control negativo	NEG	N/A	N/A

Tabla 21. Resultados de ensayo inter-termociclador de VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = ciclo umbral. ( $\bar{x}$ ) = media aritmética del Ct, ( $\sigma$ ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, NEG = negativo, N/A.= no aplica.

En conclusión, el estudio de precisión confirma el funcionamiento fiable y la consistencia de VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

### 12.4.3. Exactitud

El experimento de exactitud se llevó a cabo mediante el análisis de paneles de Programas de Evaluación Externa de la Calidad (EQA). Se analizaron muestras que contenían VHS-1, VHS-2 o *T. pallidum*, entre otros microorganismos no diana. Todos los resultados de las pruebas, que se muestran en la tabla siguiente, se compararon con los informes finales proporcionados por los organizadores de los Programas EQA.

Diana	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)

Tabla 22. Resultados de exactitud utilizando VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (ORA) = acuerdo global, (TP) = verdaderos positivos, (TN) = verdaderos negativos, (FP) = falsos positivos, (FN) = falsos negativos, (PPA) = porcentaje de acuerdo positivo, (NPA) = porcentaje de acuerdo negativo.

En conclusión, el VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System ofrece una alta exactitud en la detección de DNA de VHS-1, VHS-2 y *T. pallidum*, con excelentes valores de NPA y PPA para todas las cepas testadas.

## 12.5. Especificidad y reactividad analítica

La especificidad y reactividad analítica se evaluaron para el producto VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System *in silico* y experimentalmente, empleando diferentes materiales de partida como cepas de referencia certificadas, RNA/DNAs de referencia certificados, así como material procedente de programas EQA.

### 12.5.1. Especificidad analítica

La especificidad analítica es la habilidad del ensayo para detectar la diana prevista. Hay cuatro componentes a tener en cuenta para la especificidad analítica: la reactividad cruzada, la coinfección, la interferencia microbiana y la interferencia de sustancias. La reactividad cruzada puede ocurrir cuando microorganismos genéticamente relacionados están presentes en una muestra de paciente, mientras que la interferencia microbiana puede ocurrir si esos microorganismos genéticamente relacionados alteran la detección de los microorganismos diana cuando estos están presentes. Del mismo modo, el estudio de coinfección pretende evaluar si los microorganismos diana en diferentes concentraciones en la misma muestra pueden alterar la detección entre ellos. Por último, la interferencia de sustancias puede ocurrir si la presencia de sustancias específicas potencialmente presentes en las matrices de las muestras afecta al rendimiento de la qPCR.

#### Reactividad cruzada: ensayo *in silico*

La reactividad cruzada se evaluó utilizando secuencias de referencia de diferentes patógenos del NCBI Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y con herramientas de alineamiento como BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y un software de análisis bioinformático interno. Los resultados a mostrar solo presentan secuencias con un porcentaje de homología superior al 80%. Las secuencias alineadas con un porcentaje de homología inferior al 80% se consideraron improbables de ser detectadas.

#### *Treponema pallidum*

Todas las secuencias analizadas mostraron un porcentaje de homología inferior al 80% con el set de primers y sondas de *T. pallidum*.

El análisis *in silico* de reactividad cruzada reveló una homología del 100% con *Treponema paraluisuniculi* (Taxid ID: 53435 y 545766). Sin embargo, según una búsqueda en el NCBI, estas secuencias resultaron ser heterotípicas o taxonómicamente sinónimas y también corresponden a *Treponema pallidum*.

**Por lo tanto, ninguna de las secuencias analizadas, incluyendo aquellas que muestran una homología mayor del 80%, podrían afectar en la correcta detección de *Treponema pallidum*.**

### Alfaherpesvirus humano 1

Todas las secuencias analizadas mostraron un porcentaje de homología inferior al 80% con el set de primers y sondas de VHS-1.

El análisis *in silico* de reactividad cruzada reveló una homología del 98,33% con la cepa 105640 del herpesvirus alfa-1 del chimpancé (Taxid ID: 332937). El hospedador de esta cepa de herpesvirus alfa es el chimpancé (*Pan troglodytes*). Los herpesvirus son altamente específicos de hospedador y comparten una larga evolución sincrónica con sus hospedadores. Este virus no se ha identificado en humanos y no se considera virus zoonótico por el momento, por lo que no interfiere en la detección del VHS-1.

Por lo tanto, ninguna de las secuencias analizadas, incluyendo aquellas que muestran una homología mayor del 80%, podrían afectar en la correcta detección de VHS-1.

### Alfaherpesvirus humano 2

Todas las secuencias analizadas mostraron un porcentaje de homología inferior al 80% con el set de primers y sondas de VHS-2.

En conclusión, los diseños diana VHS-1, VHS-2 y *T. pallidum* de VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System no deberían causar falsos positivos en la detección de *Treponema pallidum*, alfaherpesvirus humano 1 y alfaherpesvirus humano 2 cuando hay otros organismos presentes.

### Especificidad analítica: ensayo experimental

#### Reactividad cruzada: ensayo experimental

La reactividad cruzada de VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System fue confirmada probando un panel de diferentes microorganismos asociados con síntomas de infecciones de transmisión sexual o microorganismos relevantes desde el punto de vista medioambiental y filogenético. Cuando fue posible y se disponía de datos de concentración, se evaluaron los microorganismos interferentes a niveles clínicamente relevantes (normalmente 1E+05 - 1E+06 ufc (unidad formadora de colonias)/ml para bacterias/hongos y 1E+04 - 1E+05 ufp (unidad formadora de placas)/ml para virus). No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los microorganismos diana:

Pruebas de reactividad cruzada				
<i>Acinetobacter baumannii</i> 5377 [NCDC KC 755]	-	<i>Haemophilus influenzae</i> cepa L-378	-	<i>Listeria monocytogenes</i> Serovar 4b
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius 1863 CECT 2071	-	Hepatitis A HM175/18f	-	Virus de la viruela del mono
<i>Atopobium vaginae</i>	-	Virus Herpes Simple tipo-1 1st WHO IS for HSV-1	+	<i>Mycoplasma genitalium</i> cepa M30

Pruebas de reactividad cruzada				
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Virus Herpes Simple tipo -2 1st WHO IS for HSV-2	+	<i>Mycoplasma hominis</i> cepa LBD-4
<i>Candida albicans</i>	-	Virus Herpes 2 cepa MS	+	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> cepa NCTC 8375 [B 5025]
<i>Candida glabrata</i>	-	Virus herpes humano 1 cepa HF	+	<i>Neisseria meningitidis</i> cepa M2091
<i>Candida krusei</i> Issatchenka orientalis Kudryavtsev 1960 CECT 1433	-	Virus herpes humano 1 cepa F	+	<i>Proteus mirabilis</i> NCDC 2059-70
<i>Candida parapsilosis</i>	-	Virus herpes humano 1 cepa KOS (ATCC-VR-1493)	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa RH 815
<i>Candida tropicalis</i> (Castellani) Berkhout 1923 CECT 1005	-	Virus herpes humano 1 cepa MacIntyre	+	<i>Serratia marcescens</i> Subsp. marcescens
<i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar E	-	Virus herpes humano 2 cepa ATCC-2011-2	+	<i>Staphylococcus aureus</i> Subsp. Aureus, cepa Seattle 1945
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Virus herpes humano 2 cepa G	+	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> cepa 810-2
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. cloacae	-	Virus del papilloma humano 16	-	DNA Control <i>Treponema pallidum</i> , Vircell
<i>Enterococcus faecalis</i> Cepa tipo CECT 8120	-	Virus del papilloma humano 18	-	<i>Treponema pallidum</i> cepa Nichols
<i>Enterococcus faecium</i> vanA, cepa CECT 5253	-	<i>Klebsiella oxytoca</i> cepa MIT 10-5243	-	<i>Treponema pallidum</i> cepa SS14
Virus Epstein-Barr 1st WHO IS for Epstein-Barr virus EBV	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> cepa UHKPC57	-	<i>Trichomonas vaginalis</i> , QCMD TV18S-01
<i>Escherichia coli</i> Cepa tipo	-	<i>Listeria innocua</i>	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i> T- cepa 960 (CX8) [960, CIP 103755, NCTC 10177]
<i>Gardnerella vaginalis</i> 594 [NCTC 10287]	-	<i>Listeria ivanovii</i> Subsp. londoniensis	-	Virus varicela zóster cepa Ellen
<i>Haemophilus ducreyi</i> Clase I	-	<i>Listeria monocytogenes</i> Serovar 1/2	-	

Tabla 23. Microorganismos patógenos de referencia incluidos en el estudio de reactividad cruzada. El resultado +/- se refiere al resultado positivo o negativo obtenido en los diferentes canales en función de la diana detectada. En caso de que un microorganismo analizado sea una de las dianas detectadas por el dispositivo, se obtiene un resultado positivo en su canal correspondiente, pero un resultado negativo en los demás canales.

En conclusión, los resultados de los ensayos de reactividad cruzada indican una alta especificidad de VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, minimizando así el riesgo de falsos positivos. Puesto que no se observan amplificaciones inespecíficas con otros microorganismos relacionados, esto sugiere que el dispositivo es capaz de distinguir con exactitud las dianas.

### Estudio de coinfección

Se realizó un estudio de coinfección, utilizando las cepas de virus herpes simple tipo 1, cepa KOS (ATCC® VR-1493 Ref. FR-310 (IRR)), virus herpes simple tipo 2, cepa MS (Ref. 0810006CF, Zeptometrix) y *Treponema pallidum*, cepa SS14 (Universidad de Washington) a diferentes concentraciones, para confirmar que la presencia de cualquiera de ellos, independientemente de la concentración, no altera la detección entre ellos. Se analizaron tres muestras naturales de lesión cutánea enriquecidas con el material de referencia, una diana a baja concentración (3xLoD) y las otras dianas a una concentración muy alta, normalmente 1E+04 - 1E+05 unidades/ml, si es posible.

Los resultados confirman que la detección de los microorganismos diana no se altera cuando se analiza con VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System en coinfección a diferentes concentraciones.

### Estudio de agentes microbianos interferentes

Se realizó un estudio de interferencia microbiana para analizar los posibles agentes microbianos interferentes para VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Se analizó un panel de diferentes microorganismos relevantes desde el punto de vista clínico, medioambiental y filogenético en presencia de las dianas VHS-1, VHS-2 y *T. pallidum* utilizando matriz natural de lesión cutánea enriquecida con virus herpes simple tipo 1, cepa KOS (ATCC® VR-1493 Ref. FR-310 (IRR)), virus herpes simple tipo 2, cepa MS (Ref. 0810006CF, Zeptometrix) y *Treponema pallidum*, cepa SS14 (Universidad de Washington). Cuando fue posible y se disponía de datos de concentración, se evaluaron los virus, bacterias y/o hongos interferentes a niveles clínicamente relevantes (normalmente 1E+05 - 1E+06 ufc (unidad formadora de colonias)/ml para bacterias/hongos y 1E+04 - 1E+05 ufp (unidad formadora de placas)/ml para virus).

Un control de matriz positiva (Positive Matrix Control, PMC) y un control de matriz negativa (Negative Matrix Control, NMC) se incluyeron como controles de la prueba. PMC corresponde a la matriz negativa enriquecida con DNA específico de las dianas sin ningún agente microbiano interferente, mientras que NMC corresponde a la matriz negativa sin ningún agente microbiano interferente.

Nombre del microorganism	Concentración evaluada	Resultado
PMC	N/A	N.I
NMC	N/A	N.I
<i>Aspergillus fumigatus</i>	No disponible	N.I
<i>Atopobium vaginae</i>	4,52E+03 ufc/µl	N.I
<i>Candida albicans</i>	4,18E+03 ufc/µl	N.I
<i>Candida glabrata</i>	2,46E+03 ufc/µl	N.I
<i>Candida parapsilosis</i>	No disponible	N.I
<i>Candida tropicalis</i>	3,04E+04 cp/µl	N.I
<i>Chlamydia trachomatis Serovar E</i>	3,20E+06 IFU/ml	N.I
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,28E+03 ufc/µl	N.I
1st WHO IS for Epstein-Barr virus EBV	5,00E+04 UI/mL	N.I
<i>Gardnerella vaginalis</i> 594 [NCTC 10287]	4,40E+05 ufc/ml	N.I
<i>Haemophilus ducreyi</i> Clase I	1,40E+02 cp/µl	N.I
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,20E+03 ufc/µl	N.I
Hepatitis A	2,80E+03 TCID50/µl	N.I
<i>Klebsiella oxytoca</i>	No disponible	N.I
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	No disponible	N.I

<i>Listeria innocua</i>	No disponible	N.I
<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>londoniensis</i>	No disponible	N.I
<i>Listeria monocytogenes</i> (CECT 4031)	2,90E+03 ufc/μl	N.I
<i>Listeria monocytogenes</i> (CECT 935)	2,70E+03 ufc/μl	N.I
<i>Mycoplasma hominis</i>	4,40E+03 ufc/μl	N.I
<i>Mycoplasma genitalium</i>	3,80E+03 ufc/μl	N.I
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6,20E+03 ufc/μl	N.I
<i>Neisseria meningitidis</i>	5,70E+04 ufc/μl	N.I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,90E+04 ufc/μl	N.I
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,60E+04 ufc/μl	N.I
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	9,20E+03 ufc/μl	N.I
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	2,00E+04 ufc/μl	N.I
<i>Acinetobacter baumannii</i> 5377 [NCDC KC 755]	8,10E+05 ufc/ml	N.I
<i>Bacteroides fragilis</i>	3,40E+02 cp/μl	N.I
<i>Enterococcus faecalis</i> cepa tipo	5,00E+05 ufc/ml	N.I
<i>Enterococcus faecium</i> vanA	3,50E+05 ufc/ml	N.I
Virus del papilloma humano 16	1,00E+03 UI/μl	N.I
Virus del papilloma humano 18	1,00E+03 UI/μl	N.I
<i>Serratia marcescens</i>	2,30E+05 ufc/ml	N.I
Virus varicela zóster	7,26E+04 ufc/ml	N.I
<i>Citrobacter freundii</i> cepa tipo	6,20E+02 ufc/μl	N.I
<i>Escherichia coli</i> cepa tipo	5,20E+02 ufc/μl	N.I
<i>Proteus mirabilis</i>	2,55E+01 ufc/μl	N.I
Virus de la viruela del mono	1,50E+03 cp/ml	N.I

Tabla 24. Estudio de agentes microbianos interferentes. N.I. = Interferencias no notificables. (PMC) = positive matrix control, (NMC) = negative matrix control, (TCID50): Dosis infecciosa de cultivo tisular 50%, (IU): Unidades Internacionales, (ufc): unidades formadoras de colonias, (cp): copias, (IFU): unidad infecciosa.

En conclusión, no se observaron interferencias en la detección de los ácidos nucleicos diana con ninguno de los microorganismos ensayados.

### Estudio de sustancias interferentes

Se realizó un estudio de sustancias interferentes para probar el posible efecto de interferencia de sustancias endógenas y exógenas en VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Se añadieron un total de 22 sustancias potencialmente interferentes a la matriz natural negativa de lesión cutánea enriquecida con las cepas de referencia: virus herpes simple tipo 1, cepa KOS (ATCC® VR-1493 Ref. FR-310 (IRR)), virus herpes simple tipo 2, cepa MS (Ref. 0810006CF, Zeptometrix) y *Treponema pallidum*, cepa SS14 (Universidad de Washington) y se evaluaron con seis réplicas.

Un control de matriz positiva (Positive Matrix Control, PMC) y un control de matriz negativa (Negative Matrix Control, NMC) se incluyeron como controles de la prueba. PMC corresponde a la matriz negativa enriquecida con DNA específico de las dianas sin sustancias interferentes, mientras que NMC corresponde a la matriz

negativa sin sustancias interferentes ni microorganismos/material de referencia añadidos. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Nombre de la sustancia	Concentración evaluada (unidades)	Resultado
PMC	N/A	N.I.
NMC	N/A	N.I.
Aciclovir	6,60E-02 mg/ml	N.I.
Albumina	1,00E+01 mg/ml	N.I.
Sangre completa	1,00E+00% (v/v)	N.I.
Leucocitos/monocitos	1,00E+06 cell/ml	N.I.
Mucina	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Clamiox (hidrocortisona)	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Neosayomol (difenhidramina)	3,87E-02 mg/ml	N.I.
Letibalm (bálsamo labial)	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Caseína	7,00E+00 mg/ml	N.I.
Hemodal (benzocaína)	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Durex Frescor	5,00E+01 µl/ml	N.I.
SOIVRE Hidratante vaginal	5,00E+01 µl/ml	I
	1,25E+01 µl/ml	N.I.
Liade (pomade antibiótica)	7,20E+00 mg/ml	N.I.
Orina femenina	1,00E+01% (v/v)	N.I.
Orina masculina	1,00E+01% (v/v)	N.I.
Heces	2,20E-01 % (v/v)	N.I.
Semen	5,00E+00% (v/v)	N.I.
Halibut (crema)	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Crema vaginal	7,50E-01 mg/ml	N.I.
Maicena	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Talquistina	2,64E+00% (v/v)	I
	6,60E-01% (v/v)	I
	3,30E-01% (v/v)	I
	1,70E-01% (v/v)	N.I.
Tioconazol	2,50E+00 mg/ml	N.I.

Tabla 25. Sustancias potencialmente interferentes. N.I: Interferencias no notificables / I: Interferencia

Diferentes sustancias potencialmente interferentes, tanto endógenas como exógenas, han sido evaluadas con VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Se observaron interferencias al evaluar SOIVRE Hidratante vaginal a 50 µl/ml y Talquistina al 2,64% (v/v). Se realizaron diluciones hasta alcanzar la concentración en la que ya no se observaban estos efectos de interferencia: 12,5 µl/ml para SOIVRE Hidratante vaginal y 0,17% (v/v) para Talquistina. Los resultados obtenidos permitieron

concluir que, a las concentraciones finales testadas no se observan interferencias para ninguna de las sustancias evaluadas.

### 12.5.2. Reactividad analítica

La reactividad analítica puede definirse como el porcentaje de cepas microbianas diana o muestras de DNA/RNA que dan un lugar a resultados positivos correctos. La reactividad analítica se estudió mediante análisis in silico y experimentales.

#### Reactividad analítica: evaluación *in silico*

La reactividad analítica de VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System se evaluó utilizando bases de datos de secuencias de nucleótidos disponibles públicamente como NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y un programa interno de análisis bioinformático, para demostrar que los genes diana pueden detectarse correctamente con el dispositivo. El análisis in silico del diseño de los cebadores y las sondas se realizó mediante alineamiento frente a un total de 4.941 secuencias analizadas (secuencias descargadas de la base de datos con duplicados eliminados) para *T. pallidum*, 9.779 para VHS-1 y 8.689 para VHS-2. Los resultados obtenidos tras el análisis de las secuencias incluidas se muestran en la siguiente tabla:

Treponema pallidum					
Gen	Secuencias alineadas: 607				
	Sin desajustes ("mismatches")	Con desajustes ("mismatches")	Secuencias con detección confirmada	Secuencias sin detección	Secuencias con detección desconocida
<i>16S rRNA</i>	99,84%	0,16%	99,84%	0%	0,16%
Alfaherpesvirus humano_1					
Gen	Secuencias alineadas: 513				
	Sin desajustes ("mismatches")	Con desajustes ("mismatches")	Secuencias con detección confirmada	Secuencias sin detección	Secuencias con detección desconocida
<i>UL1</i>	87,33%	12,67%	97,66%	0%	2,34%
Alfaherpesvirus humano_2					
Gen	Secuencias alineadas: 549				
	Sin desajustes ("mismatches")	Con desajustes ("mismatches")	Secuencias con detección confirmada	Secuencias sin detección	Secuencias con detección desconocida
<i>US4</i>	93,44%	6,56%	93,44%	0%	6,56%

Tabla 26. Análisis *in silico* de la reactividad analítica. "Secuencias alineadas" = número de secuencias alineadas sin o con desajustes del total de secuencias analizadas, "Secuencias con detección confirmada" = secuencias sin desajustes o analizadas experimentalmente cuya detección está garantizada, "Secuencias sin detección" = secuencias previamente analizadas *in silico* cuya detección experimental no puede garantizarse debido a pruebas experimentales negativas previas, "Secuencias con detección desconocida" = secuencias previamente analizadas *in silico* cuya detección experimental no puede garantizarse debido a la falta de pruebas experimentales.

En resumen, el análisis de inclusividad mostró una detección correcta de los genes *16S rRNA*, *UL1* y *US4* de *T. pallidum*, VHS-1 y VHS-2, respectivamente, con VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

## Reactividad analítica: evaluación experimental

La reactividad analítica de VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System para VHS-1 se evaluó frente al DNA de Virus Herpes humano 1, cepa HF (ATCC código VR-260), Virus Herpes humano 1, cepa MacIntyre (ATCC código VR-539), Virus Herpes humano 1, cepa F (ATCC code VR-733) y el estándar de la OMS “1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-1 (HSV-1) (NIBSC 16/368)”, mostrando resultados positivos.

La reactividad analítica de VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System para VHS-2 se evaluó frente al DNA de Virus Herpes humano 2, cepa G (ATCC código VR-3393), Virus Herpes humano 2, cepa ATCC-2011-2 (ATCC código VR-1779) y el estándar de la OMS “1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-2 (HSV-2) (NIBSC 17/122)”, mostrando resultados positivos.

La reactividad analítica de VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System para *T. pallidum* se evaluó frente al DNA de *Treponema pallidum*, cepa Nichols (Universidad de Washington) y *Treponema pallidum* DNA Control (Vircell MBC109), mostrando resultados positivos.

## 12.6. Trazabilidad metrológica

Este dispositivo no está diseñado para fines de medición.

## 13. Características del funcionamiento clínico

El funcionamiento clínico de VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System fue evaluado utilizando muestras de hisopos de lesiones cutáneas anogenitales y orales recogidas por personal de enfermería utilizando Copan eSwab®. Para la recogida, el hisopo estéril (FLOQSwab) se introdujo en el vial suministrado que contenía 1 mL de Copan's Liquid Amies Elution Swab. Los resultados fueron los siguientes:

	Lugar	Tipo de muestra	Proceso	Diana
1	Certest Biotec S.L. (Zaragoza, España) en colaboración con el Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza, España) utilizando muestras del Biobanco del Sistema de Salud de Aragón (BSSA)	Hisopos de lesión cutánea anogenital y oral (Estudio retrospectivo)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	VHS-1
				VHS-2
				<i>T. pallidum</i>
2	Certest Biotec S.L. (Zaragoza, España) utilizando muestras de Cerba Xpert	Hisopos de lesión cutánea anogenital y oral (Estudio retrospectivo)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	VHS-1
				VHS-2
				<i>T. pallidum</i>

Tabla 27. Lugar, tipo de muestras, proceso y diana.

Los verdaderos valores positivos y negativos, los valores de falsos positivos y negativos, la sensibilidad, especificidad, los valores predictivos positivos (PPV) y valores predictivos negativos (NPV) y cociente de verosimilitud (LR) para VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System fueron calculados. Los resultados y análisis de los diferentes estudios se recopilaron como un único valor de referencia debido a que ambos estudios utilizaron el mismo método de referencia, tipo de muestras y criterios de inclusión/exclusión. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Centro	Ensayo comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV	LR+	LR-
1+2	Allplex™ Genital Ulcer Assay (Seegene)	VHS-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)
		VHS-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)

Tabla 28. Valores de verdadero positivo (TP) y negativo (TN), valores de falso positivo (FP) y falso negativo (FN), sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos (PPV), valores predictivos negativos (NPV) y cociente de verosimilitud (LR) para VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

En conclusión, estos resultados muestran un alto nivel de concordancia para detectar VHS-1, VHS-2 y *T. pallidum* utilizando VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

## Bibliografía

- 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., Šmajis, 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>

## Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

<b>IVD</b>	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Almacenar en lugar seco		Fecha de caducidad		Fabricante	<b>LOT</b>	Número de lote
	Consultar las instrucciones de uso		Limitación de temperatura		Contiene <n> test		Identificación única de dispositivo	<b>REF</b>	Número de referencia
	Marcado CE		Mantener fuera de la luz del sol						

## Marca registrada

BD MAX™ es una marca registrada de Becton, Dickinson and Company.

Derechos de modificación reservados. Todos los derechos reservados. © Certest Biotec, S.L.

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



Certest Biotec, S.L.

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

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

### Información distribuidor en Australia:

Becton Dickinson Pty Ltd., 66 Waterloo Road.

Macquarie Park NSW 2113, Australia

### Información distribuidor en Nueva Zelanda:

Becton Dickinson Limited, 14B George Bourke Drive.

Mt. Wellington Auckland 1060, New Zealand

Control de Cambios		
Versión nº	Cambios	Fecha
00	Versión original. Esta versión es una traducción del documento en inglés: IUo-444222en0725.00	28/07/2025

Tabla A 2. Tabla de control de cambios.

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](mailto:viasure@certest.es)

 [www.certest.es](http://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.