VIASURE
by certest

Real Time PCR Detection Kit

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

Upute za uporabu

CE 2797 IVD

Ove upute za uporabu odnose se na sljedeću referencu:

PROIZVOD	REFERENCA
VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System	444222

Tablica A 1. Referenca za proizvod koji će se koristiti sa sustavom BD MAX™ System.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LT Norėdami atsisiųsti IFUS kitomis kalbomis, eikite į **certest.es/viasure/labeling**. Ten atlikite nurodymus, kad pasiektumėte reikiamą kalbą. Jei reikia papildomos informacijos, kreipkitės adresu: viasure@certest.es.

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

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

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

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

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

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

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

Ako vašeg jezika nema na popisu, pogledajte **www.certest.es**. Ako vašeg jezika nema na web-mjestu, obratite se na viasure@certest.es.

Napomena: Korisnik treba obavijestiti proizvođača i nadležno tijelo države članice u kojoj ima sjedište kao korisnik i/ili pacijent o svakom ozbiljnom incidentu povezanom s proizvodom.

Sadržaj

1. Namjena 6
2. Sažetak i objašnjenje 6
3. Načelo postupka 7
4. Reagensi koji se isporučuju 8
5. Reagensi i oprema koju mora pribaviti korisnik 8
6. Uvjeti transporta, skladištenja i korištenja 9
7. Mjere opreza za korisnike 9
8. Testni postupak 11
8.1. Prikupljanje, transport i pohrana uzoraka 11
8.2. Priprema uzoraka i ekstrakcija DNA 12
8.3. Protokol za PCR 12
8.3.1. Kreiranje programa za test PCR-a za VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System 12
8.3.2. Postavljanje BD MAX™ stalka 15
8.3.3. Postavljanje BD MAX™ instrumenta 16
8.3.4. Izvješće o rezultatima BD MAX™ 17
9. Tumačenje rezultata 17
10. Ograničenja testa 19
11. Kontrola kvalitete 20
12. Značajke analitičke učinkovitosti 21
12.1. Analitička linearnost 21
12.2. Analitička osjetljivost 22
12.2.1. Granica praznog uzorka (LoB) 22
12.2.2. Granica osjetljivosti testa (LoD) 22
12.3. Mjerni raspon 23
12.4. Točnost 23
12.4.1. Istinitost 23
12.4.2. Preciznost 24
12.4.3. Točnost 27

12.5. Analitička specifičnost i reaktivnost 27

12.5.1. Analitička specifičnost 27

12.5.2. Analitička reaktivnost 32

12.6. Metrološka sljedivost 33

13. Značajke kliničke učinkovitosti 34

Literatura 35

Simboli za IVD komponente i reagense 36

Robni žigovi 36

HRVATSKI

1. Namjena

VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System je automatizirani test qPCR osmišljen za istovremenu kvalitativnu detekciju DNA virusa Herpes simplex 1 (HSV-1), virusa Herpes simplex 2 (HSV-2) i *Treponema pallidum* (sifilis) u brisevima anogenitalnih i oralnih kožnih lezija bolesnika kod kojih je njihov zdravstveni djelatnik izrazio sumnju na infekciju HSV-1, HSV-2 i *T. pallidum*. Predviđeno je da se ovaj test koristi kao pomoć u dijagnosticiranju infekcije gore navedenim mikroorganizmom u kombinaciji s kliničkim znakovima i simptomima pacijenta i/ili s epidemiološkim faktorima rizika. Pozitivni rezultati ukazuju na prisutnost ciljane nukleinske kiseline (NA), ali ne isključuju prisutnost drugih patogena koje test ne detektira. Negativni rezultati ne isključuju prisutnost ciljanih NA i ne smiju se koristiti kao jedini temelj za odlučivanje o liječenju ili pružanju druge zdravstvene skrbi bolesniku. Test koristi sustav BD MAX™ System za automatiziranu ekstrakciju DNA, a zatim kvantitativnu lančanu reakciju polimeraze (qPCR), s priloženim reagensima u kombinaciji s univerzalnim reagensima i jednokratnim materijalom za sustav BD MAX™ System. DNA se ekstrahira iz uzoraka, amplificira primjenom qPCR-a i detektira primjenom specifičnih početnica i fluorescentnih sondi s reporterskom bojom za HSV-1, HSV-2 i *T. pallidum*.

Proizvod je namijenjen korištenju od strane kvalificiranog i obučenog kliničkog laboratorijskog osoblja koje je posebno upućeno i educirano o tehnikama PCR-a u stvarnom vremenu i *in vitro* dijagnostičkih postupaka (uključujući edukaciju o instrumentu za PCR u stvarnom vremenu (termocikler) i sustavu za ekstrakciju nukleinske kiseline).

2. Sažetak i objašnjenje

Ljudski virus Herpes simplex (HSV) tipa 1 i 2 dva su od najraširenijih ljudskih virusa u svijetu, koji se obično povezuju s bolestima kao što su groznice, genitalni herpes, herpetični stromalni keratitis, meningitis i encefalitis (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). HSV prvenstveno pogađa kožu i sluznicu, uzrokujući perzistentne infekcije koje se sastoje od razdoblja mirovanja (latencije) i rekurentne bolesti (reaktivacije) (Cole, 2020; Minaya et al., 2017). Prijenos HSV-1 i HSV-2 događa se oralnim kontaktom, dok se infekcije HSV-2 javljaju kasnije, obično spolnim prijenosom, a kliničke manifestacije tih virusa vrlo su varijabilne: asimptomatske, blage ili opasne po život (Cole, 2020; WHO, 2023; Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). U većine imunokompetentnih osoba HSV uzrokuje blagu bolest koja prolazi sama od sebe (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). Međutim, infekcija HSV-om također je povezana s visokim morbiditetom i mortalitetom u određenih osoba, poput imunokompromitiranih bolesnika koji boluju od rekurentne infekcije HSV-om (Cole, 2020; Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). Primijećeno je da infekcija jednim tipom HSV-a tipično stvara imunitet koji sprječava ponovnu infekciju istim serotipom, ali ne i drugim (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021).

Spiroheta *Treponema pallidum* prepoznata je kao uzročnik venerićnog sifilisa, framboezije, endemskog sifilisa i pinte, a sve su to višestadijske infekcije koje se mogu razlikovati samo na temelju kliničkih, epidemioloških i geografskih kriterija (Mercuri et al., 2022; Peeling et al., 2023; Radolf et al., 2016; Tudor et al., 2022). *T. p. pertenue* povezana je s framboezijom, *T. carateum* s pintom, a *T. p. endemicum* s endemskim sifilisom, ali *T. pallidum* podvrsta *pallidum* jedina je podvrsta povezana s venerićnim sifilisom (Mercuri et al., 2022; Tudor et al., 2022).

Sifilis napreduje kroz više stadija, od kojih svaki ima različite znakove i simptome, kao što su šankeri u primarnom sifilisu te osipi ili čirevi u sekundarnom sifilisu (CDC, 2023; Mercuri et al., 2022; Peeling et al., 2023). Zbog raznolikosti kliničkih manifestacija, sifilis je dobio nadimak „veliki imitator" (Peeling et al., 2023; Tudor et al., 2022). Ova bolest je tijekom povijesti pogađala različite rizične populacije, a iako je gotovo iskorijenjena 1998. godine, njezina je incidencija u porastu od 2000. godine (Mercuri et al., 2022).

Utvrdjivanje razlike između HSV-1 i HSV-2 uvijek je preporučljivo jer utječe na prognozu i liječenje. Centri za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC) u SAD-u preporučuju potvrđivanje kliničke dijagnoze tipiziranim virološkim i serološkim testovima (Cole, 2020). Pouzdana laboratorijska metoda za dijagnosticiranje akutnih genitalnih infekcija HSV-om je detekcija DNA HSV-1 i HSV-2 lančanom reakcijom polimeraze (PCR) (Cole, 2020). Što se tiče *T. pallidum*, za laboratorijsku dijagnostiku koriste se izravna detekcija i serološko testiranje budući da se ovaj patogen ne može uzgajati (Forrestel et al., 2020). Međutim, serološki testovi nisu u stanju razlikovati sifilis od drugih treponemskih infekcija zbog visoke genetske sličnosti među patogenim treponemama (Forrestel et al., 2020). Tehnike amplifikacije nukleinskih kiselina, kao što je PCR, omogućuju detekciju bakterijske DNA u kliničkim uzorcima u ranim fazama bolesti, nudeći potencijalnu strategiju za kontrolu epidemije sifilisa zbog svoje visoke osjetljivosti (Peeling et al., 2023).

3. Načelo postupka

VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System je osmišljen za istovremenu kvalitativnu detekciju DNA virusa Herpes simplex 1 (HSV-1), virusa Herpes simplex 2 (HSV-2) i *Treponema pallidum* (sifilis) u brisevima anogenitalnih i oralnih kožnih lezija. Nakon izolacije DNA, identifikacija HSV-1, HSV-2 i *T. pallidum* provodi se amplifikacijom konzervirane regije gena za *glikoprotein L UL1* virusa HSV-1, gena za *glikoprotein G US4* virusa HSV-2 i gena *16S rRNA* bakterije *T. pallidum*, uporabom specifičnih početnica i fluorescentno obojanih sondi.

VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System temelji se na aktivnosti 5' egzonukleaze DNA polimeraze. Tijekom amplifikacije DNA taj enzim rascjepljuje sondu vezanu za sekvencu komplementarne DNA, čime se razdvaja supresorsku boju od reportera. Ta reakcija dovodi do povećanja fluorescencijskog signala srazmjernog količini ciljnog predloška. Ta fluorescencija mjeri se na sustavu BD MAX™ System.

VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System sadrži u svakoj epruveti sve potrebne komponente za test PCR u stvarnom vremenu (specifične početnice/sonde, dNTP-ove, pufer i polimerazu) u stabiliziranom[1] formatu, kao i endogenu unutarnju kontrolu (EIC) (gen *humane RNAse P*) za praćenje procesa ekstrakcije i/ili isključivanje inhibicije aktivnosti polimeraze. Ljudski domaćinski geni uključeni su u osnovno održavanje stanice te se stoga očekuje da će biti prisutni u svim ljudskim stanicama s jezgrom te održavati relativno stalne razine ekspresije.

[1] Imajte na umu da se pojmovi „stabiliziran" i „liofiliziran" koriste jednako i kao sinonimi u cijelom dokumentu.

Cilj	Kanal	Gen
HSV-1	475/520	Gen *za glikoprotein L UL1*
HSV-2	530/565	Gen *za glikoprotein G US4*
T. pallidum	630/665	Gen *16S rRNA*
Endogena unutarnja kontrola (EIC)	585/630	*RNAse P*

Tablica 1. Cilj, kanal i geni.

4. Reagensi koji se isporučuju

VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System uključuje sljedeće materijale i reagense detaljno opisane u Tablici 2:

Reagens/materijal	Opis	Raspon koncentracije	Šifra	Količina
HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum reaction tube	Lioprotektori i stabilizatori	±6 g/100 ml*	1E folija	2 vrećice sa 12 prozirnih epruveta
	Nukleotidni trifosfat (dNTPs)	±1 mM*		
	Početnice i sonde	0,2 – 1 nMol/µl*		
	Enzimi	10 – 100 U/rxn*		
Rehydration Buffer tube	Mješavina fiziološke otopine	±13 mM	11 folija	1 vrećica sa 24 prozirne epruvete
	Pufer (TRIS, pH)	±67 mM		

Tablica 2. Reagensi i materijali koji se nalaze u VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System s kat. br. 444222.
*** Za komponentu u stabiliziranom formatu, raspon koncentracije znači nakon rehidracije.**

5. Reagensi i oprema koju mora pribaviti korisnik

Sljedeći popis uključuje materijale koji su potrebni za korištenje, ali nisu uključeni u VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

- Instrument za PCR u stvarnom vremenu: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 ili 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Mikropipete (precizne u rasponu od 2 do 1000 µl).
- Voda koja ne sadrži nukleazu.
- Nastavci za filtar.
- Nenaprašene jednokratne rukavice.

Neobavezno:

- Vanjski kontrolni materijali mogu se koristiti kao dio postupka kontrole kvalitete rada testa. Komercijalno dostupni kontrolni materijal i/ili uzorci prethodno okarakterizirani kao pozitivni ili negativni mogu se koristiti kao vanjska pozitivna kontrola (EPC) ili vanjska negativna kontrola (ENC). Odabir i validiranje EPC-a i ENC-a mora se obaviti u skladu s primjenjivim lokalnim, državnim i/ili saveznim propisima i standardnim postupcima kontrole kvalitete laboratorija. Osim toga, prilikom korištenja komercijalno dostupnog kontrolnog materijala, korisnik mora slijediti odgovarajuće upute za uporabu.

6. Uvjeti transporta, skladištenja i korištenja

- Kompleti se mogu transportirati i čuvati na temperaturi od 2 do 30 °C do isteka roka valjanosti navedenog na naljepnici kompleta.
- Izbjegavajte vibracije tijekom transporta kako ne bi došlo do curenja tekućine.
- Nakon otvaranja aluminijskih vrećica koje sadrže reakcijske epruvete, proizvod se može iskoristiti u roku od 28 dana na temperaturi 2 – 30 °C. Držite bočicu podalje od svjetlosti.

Sljedeća tablica prikazuje sažetak uvjeta za transport, skladištenje i korištenje kompleta u cjelini i svake pojedine komponente:

Komponenta	Uvjeti transporta	Uvjeti skladištenja	Uvjeti tijekom korištenja
Cijeli VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum Assay* for BD MAX™ System	2 – 30 °C tijekom roka trajanja navedenog na naljepnici kompleta.	**Prije korištenja:** 2 – 30 C tijekom roka trajanja navedenog na naljepnici kompleta.	** Pogledajte uvjete tijekom korištenja za svaku komponentu.*
HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum reaction tube (1E folija)		**Prije korištenja:** 2 – 30 °C tijekom roka trajanja navedenog na naljepnici kompleta. **Nakon otvaranja vrećice sa silika-gelom:** 2 – 30 °C do 28 dana.	Sobna temperatura.
Rehydration Buffer tube		**Prije korištenja:** 2 – 30 °C tijekom roka trajanja navedenog na naljepnici kompleta. **Nakon otvaranja vrećice sa silika-gelom:** 2 – 30 °C do 28 dana.	Sobna temperatura.

Tablica 3. Sažetak uvjeta za transport, skladištenje i korištenje VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System i svake komponente.

7. Mjere opreza za korisnike

- Proizvod je namijenjen korištenju od strane kvalificiranog i educiranog kliničkog laboratorijskog osoblja koje je posebno educirano i osposobljeno za tehnike PCR-a u stvarnom vremenu i postupaka dijagnostike *in vitro*.
- Za *in vitro* dijagnostičku upotrebu.
- Upute za uporabu proizvoda VIASURE i korisnički priručnik za BD MAX™ System moraju se pažljivo pročitati prije korištenja testa VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Nemojte obavljati test dok ne shvatite informacije o postupcima, sigurnosnim mjerama opreza i ograničenjima opisanima u njima.
- Nemojte koristiti reagense i/ili materijale kojima je istekao rok valjanosti.
- Nemojte koristiti komplet ako je potrgana naljepnica kojom je zatvorena vanjska kutija.
- Nemojte koristiti reagense ako je zaštitna kutija otvorena ili oštećena po prispijeću.
- Nemojte koristiti reagense ako su zaštitne vrećice otvorene ili oštećene po prispijeću.
- Nemojte koristiti reagense ako desikant u vrećicama s reagensima nije prisutan ili je oštećen.
- Nemojte vaditi desikant iz vrećica s reagensima.
- Nemojte koristiti reagense ako je folija potrgana ili oštećena.
- Nemojte miješati reagense iz različitih vrećica, kompleta i/ili serija.
- Nakon svake upotrebe odmah zatvorite zaštitne vrećice s reagensima pomoću patentnog zatvarača radi zaštite glavne smjese od sunčeve svjetlosti. Prije zatvaranja istisnite višak zraka iz vrećica.
- Zaštitite reagense protiv vlage. Duže izlaganje vlazi može utjecati na učinkovitost proizvoda.
- Kako ne bi došlo do oštećenja naljepnice, nemojte koristiti proizvod u blizini otapala.

- Izgled reakcije smjese u stabiliziranom formatu koji se obično nalazi na dnu epruvete razlikuje se od uobičajenog (bez stožastog oblika, inhomogeni, manji/veći i/ili bojom različit od bjeličastog) ne mijenja funkcionalnost testa.
- Pazite da su reakcijska epruveta i epruveta s rehidracijskim puferom sigurno postavljene na svoje mjesto prilikom postavljanja stalka BD MAX™ System.
- U slučajevima gdje se drugi testovi PCR-om obavljaju u istom općem prostoru laboratorija potreban je oprez kako ne bi došlo do kontaminacije testa VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, kompleta za ekstrakciju BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, ili bilo kojih dodatnih reagensa potrebnih za testiranje i za BD MAX™ sustav. Svakako izbjegavajte kontaminaciju reagensa s mikrobima i ribonukleazama (RNase)/deoksiribonukleazama (DNase). Preporučuje se uporaba jednokratnih, sterilnih vrhova volumetrijskih pipeta ili otpornih na aerosol, bez Rnase/Dnase. Koristite novi vrh sa svakim uzorkom. Rukavice se moraju promijeniti prije rukovanja reagensima i patronama (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Radi sprječavanja kontaminacije okruženja amplikonima, nemojte odvajati PCR patronu BD MAX™ Cartridge nakon uporabe. Brtve na PCR patroni BD MAX™ Cartridge dizajnirane su za sprječavanje kontaminacije.
- Koristite jednosmjeran radni proces. Treba započeti u području za ekstrakciju, a zatim preći u područje za amplifikaciju i detekciju. Nemojte vraćati uzorke, opremu i reagense u područje u kojem je obavljen prethodni korak.
- Pridržavajte se dobre laboratorijske prakse. Nosite zaštitnu odjeću, jednokratne rukavice, zaštitne naočale i masku. Nemojte jesti, piti, pušiti niti nanositi kozmetičke proizvode u radnom prostoru. Operite ruke nakon što završite test.
- Uzorci se moraju smatrati potencijalno zaraznima i/ili biološki opasnima, a isto vrijedi za reagense i materijale koji su bili izloženi uzorcima i mora se njima rukovati u skladu s nacionalnim sigurnosnim propisima. Poduzmite neophodne mjere opreza prilikom prikupljanja, transporta, pohrane, rukovanja i odlaganja uzoraka u otpad.
- Uzorcima i reagensima potrebno je rukovati u biološkom zaštitnom kabinetu. Koristite osobnu zaštitnu opremu (OZO) u skladu s važećim smjernicama za rukovanje potencijalno zaraznim uzorcima. Zbrinite otpad u skladu s lokalnim i državnim propisima.
- Preporučuje se redovita dekontaminacija opreme koja se često koristi, naročito mikropipeta i radnih površina.
- U skladu s Uredbom (EZ) br. 1907/2006. (REACH), kompleti VIASURE za BD MAX™ System ne zahtijevaju sigurnosne listove materijala (Material Safety Data Sheets) zbog njihove klasifikacije kao neopasni za zdravlje i okoliš jer ne sadrže tvari i/ili smjese koje udovoljavaju kriterijima za razvrstavanje opasnosti dostupne u Uredbi (EZ) br. 1272/2008. (CLP) ili koje su u koncentracijama višim od vrijednosti utvrđene u spomenutoj uredbi za njihovo prijavljivanje. Tvrtki Certest Biotec S.L. može se podnijeti zahtjev za izdavanje izjave kojom se potvrđuje da nije potreban sigurnosni list materijala (Material Safety Data Sheet).
- Pazite da je definicija programa testa za PCR na sustavu BD MAX™ System napravljena prema uputama u odjeljku „Protokol za PCR" (parametri ekstrakcije uzorka, zadani crtični kodovi, postavke za PCR itd.).
- Posavjetujte se s Korisničkim priručnikom za sustav BD MAX™ System u vezi s dodatnim upozorenjima, mjerama opreza i postupcima.
- Potvrda o analizi nije priložena uz uređaj, no može se preuzeti s web-mjesta Certest Biotec S.L. (www.certest.es) u slučaju potrebe.

8. Testni postupak

8.1. Prikupljanje, transport i pohrana uzoraka

VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System testiran je na uzorcima briseva anogenitalnih i oralnih kožnih lezija prikupljenih korištenjem Copan ESwab® (Copan's Liquid Amies Elution Swab) (u daljnjem tekstu prirodni uzorci kožnih lezija). Drukčije vrste uzoraka mora validirati korisnik.

Prikupljanje, pohrana i transport uzoraka treba obavljati u uvjetima koje je validirao korisnik. Općenito, kliničke uzorke treba prikupiti i označiti na odgovarajući način u čiste spremnike s transportnim medijem ili bez njega (ovisno o vrsti uzorka). Nakon prikupljanja, uzorke treba staviti u vrećicu s oznakom bioopasnosti te ih treba transportirati i obraditi što je prije moguće da bi se zajamčila kvaliteta testa. Uzorci se trebaju transportirati na sobnoj temperaturi, ili na temperaturi od 2±2 °C do 48 sati, u skladu s lokalnim i nacionalnim propisima za transport patogenih materijala. Za dugotrajni transport preporučujemo otpremanje na temperaturi od -20 °C ili nižoj[2]. Uzorci prikupljeni za molekularno testiranje moraju se čuvati u kontroliranim uvjetima kako se nukleinske kiseline ne bi razgradile tijekom skladištenja. Preporučuje se korištenje svježih uzoraka za test, ali u slučaju da to nije moguće ili u slučaju retrospektivne studije, uzorke treba pohraniti na temperaturi od -70 ili -80 °C, a kao druga opcija, na temperaturi od -20 °C[3].

Klinički uzorci moraju se prikupljati, transportirati i pohraniti u skladu s odgovarajućim laboratorijskim smjernicama i/ili priručnicima o pravilima laboratorija. Kao primjere, pogledajte smjernicu Američkog društva za zarazne bolesti (IDSA) (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) ili 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 Infecc. y Microbiol. Clin. (English ed.) 37, 127–134 (2019).

Napomena: Navedeni uvjeti prikupljanja, transporta i pohrane uzoraka predloženi su na temelju preporuka za uzorke iz genitourinarnog trakta namijenjene za detekciju nukleinskih kiselina, kako je navedeno u referentnim smjernicama koje su prethodno navedene. Ipak, preporučujemo da se pridržavate smjernica laboratorija i/ili priručnika o pravilima laboratorija za pravilni transport i očuvanje uzoraka.

Interna studija stabilnosti uzoraka provedena je s VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System koristeći negativnu matricu prirodnih kožnih lezija s dodatkom virusa Human herpesvirus 1, soj KOS (ATCC® VR-1493 Ref. FR-310 (IRR)), virus Herpes Simplex tipa 2, soj MS (Ref. 0810006CF, Zeptometrix) i *Treponema pallidum*, soj SS14 (Washington University) u koncentraciji 3xLoD. Stabilnost je analizirana pomoću tri različita testa: ugniježđena stabilnost primarnog uzorka sa stabilnošću u SBT-u na 2±2 °C i 25±2 °C, stabilnost primarnog uzorka na -20±2 °C te ciklusi smrzavanja

[2] 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).

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

(-80 °C) i odmrzavanja (25 °C). Rezultati su pokazali dobru učinkovitost pohranjenih uzoraka u svim testiranim uvjetima. Zaključno, što se tiče stabilnosti primarnog uzorka, prirodni uzorci kožnih lezija stabilni su nakon 48 sati na 2±2 °C i 25±2 °C. Što se tiče stabilnosti u SBT-u, uzorci su stabilni nakon 7 dana u SBT-u na 2±2 °C i 25±2 °C (nakon što su proveli do 48 sati na 2±2 °C i 25±2 °C prije dodavanja u SBT). Osim toga, uzorci su stabilni nakon 6 mjeseci pohrane na -20±2 °C i tijekom najmanje 5 ciklusa smrzavanja i odmrzavanja.

8.2. Priprema uzoraka i ekstrakcija DNA

Prikupljanje uzorka obavite u skladu s preporukama iz uputa za uporabu kompleta za ekstrakciju koji koristite, BD MAX™ ExK™ TNA-3.

1. Pipetom prenesite 500 µl uzorka u epruvetu BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube te je zatvorite čepom s membranom. Izmiješajte uzorak vrtloženjem pri visokoj brzini tijekom 1 minute. Pređite na rad s BD MAX™ System Operation.

   Napomena: Pobrinite se da se vrtloženje obavi nekoliko minuta prije pokretanja postupka. Ako se ista epruveta BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube koristi za ponavljanje testa, preporučuje se ručno protresti epruvetu nekoliko minuta prije početka testa kako bi se osiguralo pravilno homogeniziranje uzorka.

Imajte na umu da korisnik treba razviti i validirati postupke pripreme ekstrakcije specifične za primjenu te da neki drugi uzorci mogu zahtijevati prethodnu obradu.

8.3. Protokol za PCR

Napomena: Detaljne upute potražite u Korisničkom priručniku za sustav BD MAX™ System.

8.3.1. Kreiranje programa za test PCR-a za VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System

Napomena: Ako ste već kreirali test za VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, možete preskočiti korak 8.3.1 i prijeći izravno na 8.3.2.

1) Na zaslonu „Run“ (Pokreni) na sustavu BD MAX™ System odaberite karticu „Test Editor“ (Uređivač testa).
2) Kliknite na gumb „Create“ (Kreiraj).

Na kartici „Basic Information” (Osnovne informacije):

3) U polju „Test Name“ (Naziv testa) dajte ime svom testu, npr. VIASURE HHT.

   Napomena: Naziv testa mora biti jedinstven i smije imati najviše dvadeset znakova.

4) S padajućeg izbornika „Extraction Type“ (Vrsta ekstrakcije) odaberite „ExK TNA-3“.
5) S padajućeg izbornika „Master Mix Format“ (Oblik glavne smjese) odaberite „Type 5: Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer“ (Tip 5: Koncentrirani liofilizirani MM s puferom za rehidraciju).

6) U polju „Sample Extraction Parameters" (Parametri ekstrakcije uzorka) odaberite „User Defined" (Korisnički definirani) i prilagodite vrijednosti sljedećih parametara (tablica 4).

Sample Extraction Parameters **(Parametri ekstrakcije uzorka)**	***Value (units)*** **(Vrijednost (jedinice))**
Lysis Heat Time **(Vrijeme toplinske lize)**	15 (min)
Lysis Temperature **(Temperatura lize)**	55 (°C)
Sample Tip Height **(Visina vrha za uzorak)**	1600 (koraka)
Sample Volume **(Volumen uzorka)**	475 (µl)
Wash Volume **(Volumen ispiranja)**	500 (µl)
Neutralization Volume **(Volumen neutralizacije)**	N/A
DNase Heat Time **(Vrijeme zagrijavanja za DNazu)**	N/A

Tablica 4. Parametri ekstrakcije uzorka izvedene s BD MAX™ ExK™ TNA-3.

7) U polju „Ct Calculation" (Ct izračun) odaberite „Call Ct at Threshold Crossing" (Izračunaj Ct pri prelasku granice).

8) Na radnom softveru verzije 5.00 ili više te sa snap-in epruvetama s crtičnim kodom, u polju „Custom Barcodes" (Zadani crtični kodovi) odaberite sljedeću konfiguraciju:

   a. „Snap-In 2 Barcode" (Snap-In 2 crtični kod): 1E (u vezi s *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* reaction tube).

   b. „Snap-In 3 Barcode" (Snap-In 3 crtični kod): 11 (u vezi epruvete Rehydration Buffer tube).

Na kartici „PCR Settings" (Postavke za PCR):

9) U polje „PCR settings" (Postavke za PCR) unesite sljedeće parametre opisane u Tablici 5: „Alias" (Drugi naziv) (do sedam alfanumeričkih znakova), „PCR Gain" (Dobit PCR-a), „Threshold" (Prag), „Ct Min" i „Ct Max" (Ct Maks).

Channel **(Kanal)**	***Alias*** **(Drugi nazivi)**	***PCR Gain*** **(Dobit PCR-a)**	***Threshold*** **(Prag)**	***Ct Min*** **(Ct Min)**	***Ct Max*** **(Ct Maks)**
475/520 (FAM)	HSV1	40	200	0	40
530/565 (HEX)	HSV2	60	200	0	40
585/630 (ROX)	EIC	40	200	0	40
630/665 (Cy5)	TRE	60	200	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tablica 5. Postavke za PCR.
Napomena: Preporučuje se postavljanje gore navedenih minimalnih graničnih vrijednosti za svaki kanal kao početnu točku, ali završne postavke mora odrediti krajnji korisnik tijekom tumačenja rezultata kako bi se osiguralo da granice spadaju u eksponencijalnu fazu krivulja fluorescencije i iznad bilo kojeg pozadinskog signala. Granična vrijednost različitih instrumenata može se razlikovati zbog različitih intenziteta signala.

10) U polje „Color compensation" (Kompenzacija boje) unesite sljedeće parametre (Tablica 6).

		False Receiving Channel **(Kanal s lažnim rezultatima)**				
	Channel **(Kanal)**	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel **(Kanal za pobuđivanje)**	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	-

Tablica 6. Parametri „Color compensation" (Kompenzacija boje).

Na kartici „Melt Settings“ (Postavke taljenja) nije potrebna nikakva radnja, ne primjenjuje se na ovaj proizvod.

Na kartici „Test Steps“ (Koraci testa):

11) Unesite naziv koraka (do dvadeset znakova) i postavite sljedeće parametre za definiranje svakog koraka protokola za PCR: „Profile Type“ (Vrsta profila), „Cycles“ (Ciklusi), „Time“ (Vrijeme) i „Temperature“ (Temperatura) te odaberite polje „Detect“ (Detekcija) za definiranje koraka detekcije (Tablica 7). Kliknite na gumb „Add“ (Dodaj) za dodavanje novog koraka i ponavljajte postupak dok ne definirate sve potrebne korake.

    Napomena: Polje „Type“ (Vrsta) mora biti prazno.

Step (Korak)	*Step name* (Naziv koraka)	*Profile Type* (Vrsta profila)	*Cycles* (Ciklusi)	*Time (s)* (Vrijeme (s))	*Temperature* (Temperatura)	*Detect* (Detekcija)
Initial denaturation (Početna denaturacija)	IN-denaturation	*Hold*	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturacija i sparivanje/produljenje (prikupljanje podataka))	Annealing/Extension	*2-Temperature*	45	10	95 °C	-
				41	63 °C	✓

Tablica 7. Protokol za PCR.

Na kartici „Result Logic“ (Logika rezultata):

12) U polju „Target“ (Cilj) imenujte svoj cilj: tj. HSV1 (do sedam alfanumeričkih znakova). Ponavljajte korake 12 – 15 za svaki cilj (tj. HSV2 ili TRE) slijedeći tablice specifične za cilj koji se definira.

13) Kliknite na potvrdni okvir „Analyze“ (Analiziraj) za uključivanje željenih valnih duljina (kanali za PCR) u analizu ciljnog rezultata (Tablice 8 – 10).

Wavelength (Valna duljina)	*Alias* (Drugi nazivi)	*Type* (Vrsta)	*Analyze* (Analiza)
475/520	HSV1	PCR	✓
585/630	EIC	PCR	✓

Tablica 8. Odabir kanala za PCR na kartici „Result logic“ (Logika rezultata) za cilj HSV1 (Herpes simplex virus 1) .

Wavelength (Valna duljina)	*Alias* (Drugi nazivi)	*Type* (Vrsta)	*Analyze* (Analiza)
530/565	HSV2	PCR	✓
585/630	EIC	PCR	✓

Tablica 9. Odabir kanala za PCR na kartici „Result logic“ (Logika rezultata) za cilj HSV2 (Herpes simplex virus 2).

Wavelength (Valna duljina)	*Alias* (Drugi nazivi)	*Type* (Vrsta)	*Analyze* (Analiza)
585/630	EIC	PCR	✓
630/665	TRE	PCR	✓

Tablica 10. Odabir kanala za PCR na kartici „Result logic“ (Logika rezultata) za cilj TRE (*Treponema pallidum*).

14) Kliknite na gumb „Edit Logic” (Uredi logiku).

15) U prozoru „Edit Logic“ (Uredi logiku) navedene su sve kombinacije vrsta rezultata. Za svaki redak u padajućem izborniku „Result“ (Rezultat) odaberite rezultat koji se prikazuje kada su ispunjeni uvjeti u tom retku, slijedeći tablice 11 – 13.

Result (Rezultat)	HSV1 (475/520)	EIC (585/630)
POS	Valid (Valjano)	Valid (Valjano)
UNR	Valid (Valjano)	Invalid (Nevaljano)
NEG	Invalid (Nevaljano)	Valid (Valjano)
UNR	Invalid (Nevaljano)	Invalid (Nevaljano)

Tablica 11. Popis kombinacija tipova rezultata i logike rezultata za cilj HSV1 (Herpes simplex virus 1). Dostupni rezultati su POS (Pozitivno), NEG (Negativno) i UNR (Neriješeno).

Result (Rezultat)	HSV2 (530/565)	EIC (585/630)
POS	Valid (Valjano)	Valid (Valjano)
UNR	Valid (Valjano)	Invalid (Nevaljano)
NEG	Invalid (Nevaljano)	Valid (Valjano)
UNR	Invalid (Nevaljano)	Invalid (Nevaljano)

Tablica 12. Popis kombinacija tipova rezultata i logike rezultata za cilj HSV2 (Herpes simplex virus 2). Dostupni rezultati su POS (Pozitivno), NEG (Negativno) i UNR (Neriješeno).

Result (Rezultat)	TRE (630/665)	EIC (585/630)
POS	Valid (Valjano)	Valid (Valjano)
UNR	Valid (Valjano)	Invalid (Nevaljano)
NEG	Invalid (Nevaljano)	Valid (Valjano)
UNR	Invalid (Nevaljano)	Invalid (Nevaljano)

Tablica 13. Popis kombinacija tipova rezultata i logike rezultata za cilj TRE (*Treponema pallidum*) . Dostupni rezultati su POS (Pozitivno), NEG (Negativno) i UNR (Neriješeno).

Napomena: U skladu s prethodno definiranom Ct Max (tablica 5), tip rezultata za kanale HSV1 (475/520), HSV2 (530/565), EIC (585/630) i TRE (630/665) smatra se „Valid“ (Valjani) kada je dobivena Ct vrijednost ≤40; a „Invalid“ (Nevaljanim) kada je dobivena Ct vrijednost >40.

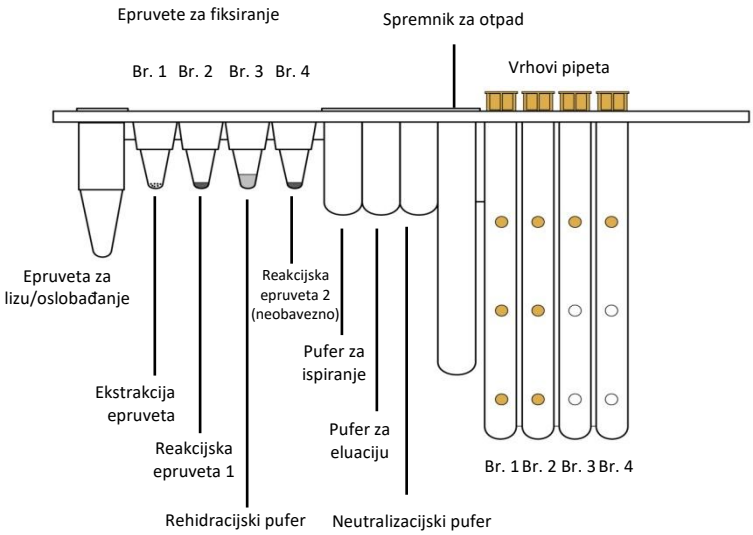
16) Kliknite na gumb „Save” (Spremi) da biste spremili test.

8.3.2. Postavljanje BD MAX™ stalka

1) Za svaki uzorak koji treba testirati izvadite pojedinačne trake s reagensima u bloku iz kompleta BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Lagano udarite svaku traku o čvrstu površinu kako biste osigurali da se sve tekućine nalaze na dnu epruveta i stavite ih na stalke za uzorke sustava BD MAX™ System.
2) Izvadite potrebni broj BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes epruveta za ekstrakciju (B4) iz njihove zaštitne vrećice. Postavite epruvetu/e za ekstrakciju (bijela folija) u njihove odgovarajuće položaje u TNA traku (položaj 1 s oznakom u boji na stalku. Pogledajte Sliku 1). Istisnite višak zraka i zatvorite vrećicu patentnom zatvaračem.
3) Odredite i razdvojite odgovarajući broj reakcijskih epruveta *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* reaction tube (1E folija) i postavite ih u njihove odgovarajuće položaje na traci (položaj 2, označen zelenom bojom na stalku. Pogledajte Sliku 1).
    a. Istisnite višak zraka i zatvorite aluminijske vrećice patentnim zatvaračem.
    b. U cilju obavljanja pravilnog postupka rehidracije pazite da se liofilizirani proizvod nalazi na dnu epruvete te da ne prianja za gornji dio epruvete ili za zatvarač od folije. Lagano pritisnite svaku epruvetu na tvrdoj površini kako biste se uvjerili da je sav proizvod na dnu epruvete.

4) Izvadite odgovarajući broj epruveta Rehydration Buffer tube (folija 11) i postavite ih u njihove odgovarajuće položaje na traci (položaj 3, nije obojen na stalku. Pogledajte Sliku 1).
    a. Istisnite višak zraka i zatvorite vrećicu patentnim zatvaračem.
    b. U cilju osiguravanja pravilnog prijenosa pazite da se tekućina nalazi na dnu epruvete te da ne prianja za gornji dio epruvete ili za zatvarač od folije. Lagano pritisnite svaku epruvetu na tvrdoj površini kako biste se uvjerili da je sav proizvod na dnu epruvete.

Slika 1. Traka BD MAX™ TNA Reagent (TNA) iz kompleta BD MAX™ ExK™ TNA-3.



8.3.3. Postavljanje BD MAX™ instrumenta

1) Odaberite karticu „Worklist“ (Radni popis) na zaslonu „Run“ (Pokreni) na sustavu BD MAX™ System s verzijom softvera v4.50A ili novijom.
2) S padajućeg izbornika „Test“ odaberite željeni test: npr. VIASURE HHT (ako test nije već kreairan, pogledajte odjeljak 8.3.1).
3) U padajućem izborniku „Kit Lot Number“ (Broj serije kompleta) odaberite odgovarajući broj serije za komplet (nalazi se na vanjskoj kutiji kompleta za ekstrakciju koji se koristi) (neobavezno).

    Napomena: Brojevi serija moraju biti definirani u prikazu „Inventory“ (Zalihe) prije nego što se ovdje mogu odabrati.
4) Unesite identifikacijski broj epruvete Sample Buffer Tube u polje „Sample tube“ (Epruveta s uzorkom) skeniranjem crtičnog koda pomoću skenera ili ručnim unošenjem broja.
5) Ispunite polje „Patient ID“ (ID bolesnika) i/ili „Accession“ (Pristup) i pritisnite tipku Tab (Tabulator) ili Enter. Nastavite s postupkom dok ne unesete sve crtične kodove epruveta Sample Buffer Tube. Pazite da se ID uzorka/bolesnika i epruvete Sample Buffer Tube podudaraju.
6) Stavite pripremljenu epruvetu za uzorak s puferom na BD MAX™ stalak/stalke.
7) Stavite stalak/stalke u sustav BD MAX™ System (stalak A se nalazi na lijevoj strani sustava BD MAX™ System, dok se stalak B nalazi na desnoj strani).
8) Stavite potrebni broj patrona BD MAX™ PCR Cartridge(s) u sustav BD MAX™ System.

9) Zatvorite vrata sustava BD MAX™ System.
10) Kliknite „Start“ (Pokreni) da započnete postupak.

8.3.4. Izvješće o rezultatima BD MAX™

1) Na traci izbornika kliknite na gumb „Results“ (Rezultati).
2) Kliknite dvaput na svoj postupak na popisu ili pritisnite gumb „view“ (prikaz).
3) Gumbi „Print“ (Ispiši) i „Export“ (Izvezi) na dnu zaslona bit će omogućeni.

Da biste ispisali rezultate:

1. Kliknite na gumb „Print“ (Ispiši).
2. U prozoru pretpregleda „Print“ (Ispiši) izvješća o postupku odaberite: „Run Details“ (Podaci o postupku), „Test Details“ (Podaci o testu) i „Plots“ (Grafikon).
3. Kliknite na „Print“ (Ispiši) za ispis izvješća ili kliknite na „Export“ (Izvezi) za izvoz izvješća u PDF-u na USB.

Da biste izvezli rezultate:

1. Kliknite na gumb „Export“ (Izvezi) za prijenos izvješća (PDF i CSV datoteke) na USB.
2. Kada je izvoz dovršen, ikona uspjeha/neuspjeha pojavljuje se u prozoru „Results Export“ (Rezultat izvoza).

9. Tumačenje rezultata

Detaljne upute za analiziranje podataka potražite u Korisničkom priručniku za sustav BD MAX™ System.

Analizu podataka obavlja BD MAX™ softver prema uputama proizvođača. BD MAX™ softver kreira izvješće o Ct vrijednostima i amplifikacijskim krivuljama za svaki kanal detekcije svakog uzorka testiranog na sljedeći način:

- Ct vrijednost 0 znači da softver nije izračunao Ct vrijednost s navedenom granicom (pogledajte Tablicu 5). Amplifikacijska krivulja uzorka koja pokazuje „0“ za Ct vrijednost mora se provjeriti ručno.

- Ct vrijednost od -1 označava da nije došlo do procesa amplifikacije, da softver nije izračunao Ct vrijednost ili da je izračunata Ct vrijednost ispod navedenog praga ili iznad utvrđene Ct Max vrijednosti (granične).

- Svaku drugu Ct vrijednost treba tumačiti u vezi s amplifikacijskom krivuljom iu skladu s definiranom logikom rezultata, prema smjernicama za tumačenje uzoraka navedenim u Tablici 14.

Provjerite signal endogene unutarnje kontrole (EIC) da potvrdite funkcionira li amplifikacijska smjesa ispravno. Pored toga, provjerite da nema izvješća o kvaru sustava BD MAX™ System.

Pomoću sljedeće tablice očitajte i analizirajte rezultate:

HSV-1 (naziv cilja: HSV1)	HSV-2 (naziv cilja: HSV2)	*T. pallidum* (naziv cilja: TRE)	Interpretacija za pojedinačne uzorke bolesnika
POS	POS	POS	**Detektirana DNA HSV-1, HSV-2 i *Treponema pallidum*.**
POS	POS	NEG	**Detektirana DNA HSV-1 i HSV-2. DNA *Treponema pallidum* nije detektirana.**
POS	NEG	POS	**Detektirana DNA HSV-1 i *Treponema pallidum*. DNA HSV-2 nije detektirana.**
NEG	POS	POS	**Detektirana DNA HSV-2 i *Treponema pallidum*. DNA HSV-1 nije detektirana.**
POS	NEG	NEG	**Detektirana DNA HSV-1. DNA HSV-2 i *Treponema pallidum* nije detektirana.**
NEG	POS	NEG	**Detektirana DNA HSV-2. DNA HSV-1 i *Treponema pallidum* nije detektirana.**
NEG	NEG	POS	**Detektirana DNA *Treponema pallidum*. DNA HSV-1 i HSV-2 nije detektirana.**
NEG	NEG	NEG	**DNA HSV-1, HSV-2 i *Treponema pallidum* nije detektirana.**
UNR	UNR	UNR	**Neriješeni (UNR) rezultat dobiven u prisutnosti inhibitora reakcije PCR-a ili kada dođe do nekog općeg problema (koji nije pokriven šifrom o pogrešci) pri obradi uzorka i/ili amplifikaciji.[1]**
IND	IND	IND	**Rezultat testa nije moguće utvrditi (IND). Zbog kvara sustava BD MAX™ System. Rezultat testa prikazan u slučaju kvara instrumenta povezanog sa šifrom o pogrešci.[2]**
INC	INC	INC	**Nepotpun rezultat testa (INC). Zbog kvara sustava BD MAX™ System. Rezultat testa prikazan u slučaju neuspješnog obavljanja postupka.[2]**

Tablica 14. Tumačenje rezultata.

1 Endogena unutarnja kontrola (EIC) mora pokazati amplifikacijski signal s Ct vrijednošću ≤ 40 da bi se uzela u obzir. Ako postoji odsutnost signala za EIC ili Ct vrijednost > 40, rezultat se smatra Neriješenim (UNR) te je potrebno ponovno testiranje. Preporučuje se ponoviti test iz iste Sample Buffer Tube (SBT), iz istog uzorka pripremom nove SBT ili iz novog uzorka (u koncentriranijem obliku, ako je moguće). Također se može dogoditi da je rezultat Neriješeno (UNR) zbog prisutnosti inhibitora u PCR reakciji. U tim slučajevima preporučuje se razrijediti te uzorke u omjeru 1/10.

NAPOMENA: prirodni uzorci kožnih lezija mogu se čuvati bez prijenosa u SBT do 48 sati ako se pohranjuju na temperaturi od 2±2 °C – 25±2 °C (pohranjeni u ESwab® tvrtke Copan). U slučaju ponavljanja testa iz iste SBT, preporučuje se ručno protresti SBT kako bi se osiguralo pravilno homogeniziranje uzorka. Imajte na umu da se prirodni uzorci kožnih lezija mogu čuvati u SBT-u do 7 dana na 2±2 °C – 25±2 °C.

2 Rezultati Neodređeno (IND) ili Nepotpuno (INC) mogu se dobiti zbog kvara sustava te je potrebno ponovno testiranje. Pogledajte korisnički priručnik sustava BD MAX™ System za tumačenje kodova upozorenja i pogrešaka.

Napomena: Kada koristite vanjske kontrole, one bi trebale dati sljedeće očekivane rezultate: negativne za ENC i pozitivne za EPC (očekuje se da će poznati pozitivni uzorci biti pozitivni samo za mikroorganizme prisutne u uzorku). ENC koji daje pozitivne rezultate testa ukazuje na događaj kontaminacije ili pogrešku u rukovanju uzorkom. EPC koji daje negativne rezultate ukazuje na problem u rukovanju/pripremi uzorka. Pregledajte tehniku rukovanja/pripreme uzoraka. Kada dođe do pogreške vanjske kontrole, potrebno je ponovno testiranje.

U slučaju stalnog dvosmislenog rezultata preporučuje se pregledati upute za uporabu te proces ekstrakcije koji koristi korisnik; za potvdu ispravne učinkovitosti svakog PCR koraka te pregled parametara; te za provjeru sigmoidnog oblika krivulje i intenzitet fluoresencije.

Rezultate testa treba procijeniti zdravstveni djelatnik uzimajući u obzir anamnezu, kliničke simptome i druge dijagnostičke testove.

10. Ograničenja testa

- Rezultate testa treba procijeniti zdravstveni djelatnik uzimajući u obzir anamnezu, kliničke simptome i druge dijagnostičke testove.
- Iako se ovaj test može koristiti s drugim vrstama uzoraka, validiran je samo s uzorcima briseva anogenitalnih i oralnih kožnih lezija.
- Za dobru učinkovitost testa liofilizirani proizvod mora biti na dnu epruvete te ne smije prianjati na gornjem dijeli epruvete ili čepa od folije. Lagano pritisnite svaku epruvetu na tvrdoj površini kako biste se uvjerili da je sav proizvod na dnu epruvete.
- Moguće je da se u praznim kanalima sustava BD MAX™ System može pojaviti unakrsni razgovor ako ne postoji cilj koji treba detektirati, stoga je prilikom tumačenja rezultata potrebno odabrati samo kanale u kojima su isti amplificirani. Za sva pitanja obratite se na viasuresupport@certest.es.
- Kvaliteta testa ovisi o kvaliteti uzorka; nukleinska kiselina mora biti pravilno ekstrahirana iz kliničkih uzoraka.
- Ovaj test je samo kvalitativnitest te ne osigurava kvalitativne vrijednosti te ne ukazuje na broj prisutnih organizama. Nije moguće povezati Ct vrijednosti dobivene PCR-om s koncentracijom uzorka jer one ovise o korištenom termocikleru i samom ciklusu.
- Izuzetno niske razine ciljnog elementa ispod razine detekcije mogu biti detektirane, no moguće je da se rezultati neće moći ponoviti.
- Imajte na umu planirani raspon mjerenja testa jer uzorci s koncentracijama iznad ili ispod tog raspona mogu dati pogrešne rezultate.
- Postoji mogućnost pojave lažnih pozitivnih rezultata zbog unakrsne kontaminacije izazvane uzorcima HSV-1, HSV-2 i/ili *T. pallidum* koji sadrže visoke koncentracije ciljne DNA ili kontaminacije izazvane proizvodima koji sadrže PCR iz prethodnih reakcija.
- Specifične kombinacije početnica i sondi za detekciju gena *za glikoprotein L UL1* virusa HSV-1, gena *za glikoprotein G US4* virusa HSV-2 i gena *16S rRNA* bakterije *T. pallidum*, koje se koriste u VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, ne pokazuju značajne kombinirane homologije s ljudskim genomom, ljudskom mikroflorom ili drugim mikroorganizmima, što bi moglo rezultirati predvidljivim lažno pozitivnim rezultatima.
- Lažno negativni rezultati mogu nastati uslijed nekoliko čimbenika te njihovih kombinacija uključujući:
    - nepravilno prikupljanje uzoraka, transport, pohrana i/ili metode rukovanja.
    - Nepravilne postupke obrade (uključujući ekstrakciju RNA).
    - Degradacija virusne DNA tijekom otpreme/pohrane i/ili obrade uzorka.
    - Mutacije ili polimorfizmi na veznim regijama početnice ili sonde mogu utjecati na detekciju novih ili nepoznatih sojeva HSV-1, HSV-2 i/ili *T. pallidum*.
    - Mikrobno opterećenje u uzorku koje je ispod granice detekcije za test.

- Prisutnost qPCR inhibitora ili drugih tipova interferirajućih tvari. Nije procijenjen utjecaj cjepiva, nekih antivirusnih terapija, antibiotika, kemoterapijskih sredstva, imunosupresiva ili antimikotika korištenih za prevenciju infekcija ili tijekom liječenja infekcije.
- Učinak interferirajućih tvari procijenjen je samo za one navedene u odjeljku 12.5.1 (studija o interferirajućim tvarima) ovih uputa za uporabu. U ovom odjeljku možete provjeriti najčešće endogene i egzogene tvari koje izazivaju potpuno ili djelomično ometanje reakcije qPCR. Druge tvari koje nisu navedene u ovom dijelu mogu dovesti do pogrešnih rezultata.
- Neuspjeh u pridržavanju uputa za uporabu te prilikom postupka testiranja.

- Pozitivan rezultat testa ne ukazuje nužno na prisutnost živih mikroorganizama te ne ukazuje da su ti mikroorganizmi infektivni ili uzročni agensi za kliničke simptome. Međutim, pozitivni rezultati ukazuju na prisutnost ciljne sekvence HSV-1, HSV-2 i/ili *T. pallidum*.
- Negativni rezultati ne isključuju prisutnost DNA virusaHSV-1, HSV-2 i/ili *T. pallidum* u kliničkom uzorku i ne smiju se koristiti kao jedini temelj za odlučivanje o liječenju ili pružanju druge zdravstvene skrbi bolesniku. Nisu određene optimalne vrste uzoraka i izračun vremena vršnih razina mikroba tijekom infekcija čiji je uzrok HSV-1, HSV-2 i/ili *T. pallidum*. Za detekciju patogena može biti potrebno prikupljanje više uzoraka (vrste i vremenske točke) od istog bolesnika.
- Ako su dijagnostički testovi za druge spolno prenosive bolesti (SPB) negativni, a klinička opažanja, anamneza bolesnika i epidemiološke informacije sugeriraju da je moguća infekcija HSV-1, HSV-2 i/ili *T. pallidum*, potrebno je razmotriti mogućnost lažno negativnog rezultata i ponovnog testiranja bolesnika.
- Vrijednosti fluorescencije mogu varirati zbog višestrukih čimbenika kao što su: oprema za PCR (čak i ako je isti model), sustav ekstrakcije, vrsta uzorka, prethodna obrada uzorka itd... između ostalog.
- Pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti vrlo su ovisne o prevalenciji u svim testovima za *in vitro* dijagnostiku. Učinkovitost testa *VIASURE HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System može varirati ovisno o prevalenciji i populaciji koja se testira.
- U slučaju neriješenih, neutvrdivih ili nepotpunih rezultata primjenom VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System potrebno je ponovno testiranje. Neriješeni rezultati mogu biti posljedica prisutnosti inhibitora u uzorku ili nepravilne rehidracije epruvete s liofiliziranom reakcijskom smjesom. Ako postoji kvar na instrumentu, dobivaju se neutvrdivi ili nepotpuni rezultati.

11. Kontrola kvalitete

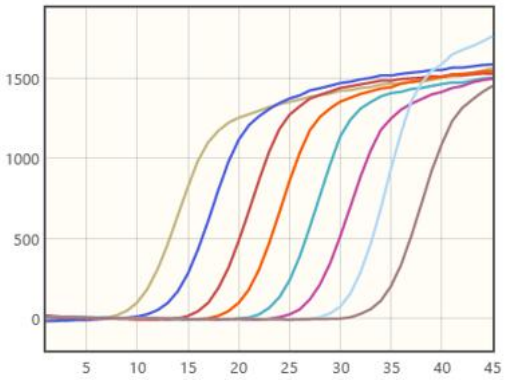
Test VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System sadrži endogenu unutarnju kontrolu (EIC) u svakoj reakcijskoj epruveti pomoću koje se potvrđuje pravilno provođenje tehnike. Osim toga, korištenje vanjskih kontrola (EPC i ENC) omogućuje potvrdu učinkovitosti testa. Sustav BD MAX™ System ne koristi vanjske kontrole u svrhu tumačenja rezultata, već ih smatra uzorkom. Vanjska pozitivna kontrola (EPC) namijenjena je praćenju moguće neispravnosti reagensa testa, dok je vanjska negativna kontrola (ENC) namijenjena detekciji kontaminacije okoline ili reagensa ciljnim nukleinskim kiselinama.

12. Značajke analitičke učinkovitosti

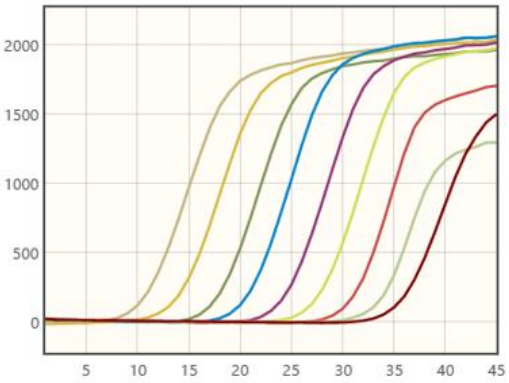
12.1. Analitička linearnost

Linearnost testa određena je i potvrđena testiranjem serije desetostrukih razrjeđenja umjetne matrice kožne lezije[4] (Artificial Matrix for Cutaneous Lesion, Biochemazone BZ394) koja sadrži poznatu koncentraciju (u rasponu od 2E+07 do 2E+01 kopija/µl) specifične i sintetske DNA koja pripada HSV-1, HSV-2 i *T. pallidum*. U nastavku je naveden primjer amplifikacijskog dijagrama koji je rezultat testa:

Slika 2. Serija razrjeđivanja predloška virusa HSV-1 (2E+07 do 2E+01 kopija/µl) analizirana na sustavu BD MAX™ System (kanal 475/520 (FAM)).

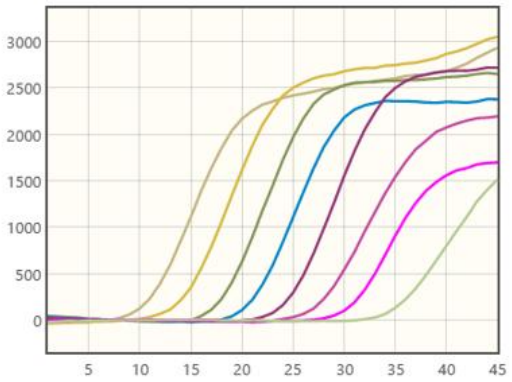


Slika 3. Serija razrjeđivanja predloška virusa HSV-2 (2E+07 do 2E+01 kopija/µl) analizirana na sustavu BD MAX™ System (kanal 530/565 (HEX)).



[4] Zbog ograničene dostupnosti uzoraka briseva anogenitalnih i oralnih kožnih lezija, provedena je studija ekvivalencije prirodne matrice u odnosu na umjetnu matricu kako bi se potvrdilo da se umjetna matrica može koristiti u validacijskim testovima. Stoga su testirane i prirodne i umjetne matrice te je potvrđeno da su ekvivalentne.

Slika 4. Serija razrjeđivanja predloška bakterije *T. pallidum* (2E+07 do 2E+01 kopija/µl) analizirana na sustavu BD MAX™ System (kanal 630/665 (Cy5)).



12.2. Analitička osjetljivost

Analitička osjetljivost često se naziva granicom osjetljivosti testa (LoD). U praksi se parametri LoD i granica praznog uzorka (LoB) određuju kao dio procjene analitičke osjetljivosti.

12.2.1. Granica praznog uzorka (LoB)

Kako bi se odredila „granica praznog uzorka“ (LoB), proveden je test bez predloška koristeći tri serije testa VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System i 24 replikata tri vrste uzoraka: prirodnih negativnih uzoraka kožnih lezija, umjetne matrice kožnih lezija i vode bez RNase/DNase.

Potvrđena je odsutnost signala u kanalima FAM, HEX i Cy5, kao i prisutnost signala za endogenu unutarnju kontrolu (EIC) u kanalu ROX u slučaju negativne matrice (prirodne ili simulirane matrice kožnih lezija). Zaključno, dobiveni rezultati potvrdili su da proizvod ne generira nespecifične amplifikacije u različitim testiranim matricama.

12.2.2. Granica osjetljivosti testa (LoD)

Granica osjetljivosti testa (LoD) testa VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* for BD MAX™ System analizirana je s tri serije korištenjem prirodnih uzoraka kožnih lezija. Referentni sojevi koji su korišteni bili su Human herpesvirus 1, soj KOS (ATCC® VR-1493, Ref FR-310 (IRR)), Herpes Simplex Virus tipa 2, soj MS (Ref, 0810006CF (Zeptometrix)) i *Treponema pallidum*, soj SS14 (Washington University). Zaključno, VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System pokazao je LoD od 2,52E+02 TCID50/ml za HSV-1, 6,30E+00 TCID50/ml za HSV-2 i 6,60E+03 stanica/ml za *T. pallidum*, s pozitivnom stopom od ≥ 95 % u prirodnim uzorcima kožnih lezija.

12.3. Mjerni raspon

Mjerni raspon testa određen je testiranjem serije desetostrukih razrjeđenja koja sadrže poznatu koncentraciju specifične DNA koja pripada virusima HSV-1, HSV-2 i bakteriji *T. pallidum*. Rezultati su omogućili potvrdu ispravne detekcije cilja u rasponu od 2E+07 do 2E+00 kopija/µl za ciljeve HSV-1 i *T. pallidum* te u rasponu od 2E+07 do 2E-01 kopija/µl za cilj HSV-2.

Zaključno, mjerni raspon testa VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System uspješno je određen, što osiguravaju pouzdani, točni i reproducibilni rezultati u širokom spektru virusnih/bakterijskih opterećenja, potvrđujući njegovu korisnost u različitim kliničkim dijagnostičkim scenarijima.

12.4. Točnost

12.4.1. Istinitost

Vjerodostojnost testa VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System procijenjena je testiranjem referentnog materijala navedenog u nastavku s dodatkom matrice kožnih lezija.

1. **Sintetski fragmenti DNA**
    - Sintetski fragment DNA za gen *glikoproteina L UL1* virusa HSV-1: HSV1.XPC, FAM kanal.
    - Sintetski fragment DNA za gen *glikoproteina G US4* virusa HSV-2: HSV2.XPC, HEX kanal.
    - Sintetski fragment DNA za gen *16S rRNA T. pallidum*: TREXPC, Cy5 kanal.

Svi sintetski fragmenti DNA detektirani su ispravno u odgovarajućem kanalu.

2. **Američka zbirka tipova kultura (ATCC®)**

Vanjska referenca	Mikroorganizam	Naziv proizvoda	Varijanta	Rezultat
VR-1493	Virus Herpes simplex 1	Human herpesvirus 1	Soj KOS	Detektiran
VR-260	Virus Herpes simplex 1	Human herpesvirus 1	Soj HF	Detektiran
VR-539	Virus Herpes simplex 1	Human herpesvirus 1	Soj MacIntyre	Detektiran
VR-733	Virus Herpes simplex 1	Human herpesvirus 1	Soj F	Detektiran
VR-3393	Virus Herpes simplex 2	Human herpesvirus 2	Soj G	Detektiran
VR-1779	Virus Herpes simplex 2	Human herpesvirus 2	Soj ATCC-2011-2	Detektiran
BAA-2642SD	*Treponema pallidum*	Quantitative Synthetic *Treponema pallidum* DNA	N/A	Nije detektiran

Tablica 15. Referentni materijal iz Američke zbirke tipova kultura (ATCC®).

Svi sojevi iz ATCC-a ispravno su detektirani u odgovarajućem kanalu, a EIC je pokazao amplifikaciju s Ct vrijednošću ≤ 40, osim za Quantitative Synthetic *Treponema pallidum* DNA (ATCC kod BAA-2642SD). Ta sintetička DNA uključuje fragmente gena *polA*, gena *23S*, gena *16S*, *flaA, 47kDa* proteina gena i *bmp,* međutim, izostanak detekcije pri vrlo visokoj koncentraciji (do 4,70E+04 kopija/µl) korištenjem VIASURE testa sugerira da ciljna regija unutar gena *16S* nije uključena u sintetičku DNA iz ATCC-a. Stoga se ne može koristiti kao referentni materijal.

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

Vanjska referenca	Mikroorganizam	Naziv proizvoda	Varijanta	Rezultat
16/368	Virus Herpes simplex 1	1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-1 (HSV-1)	N/A	Detektiran
17/122	Virus Herpes simplex 2	1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-2 (HSV-2)	N/A	Detektiran

Tablica 16. Referentni materijal Nacionalnog instituta za biološke standarde i kontrole (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC).

Svi sojevi iz NIBSC-a ispravno su detektirani u odgovarajućem kanalu, a EIC je pokazao amplifikaciju s Ct vrijednošću ≤ 40.

4. Kontrolni materijal

Vanjska referenca	Podrijetlo	Mikroorganizam	Naziv proizvoda	Varijanta	Rezultat
0810006CF	ZeptoMetrix	Virus Herpes simplex 2	Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2)	Soj MS	Detektiran
MBC109	Vircell S.L.	*Treponema pallidum*	AMPLIRUN® TREPONEMA PALLIDUM DNA CONTROL	N/A	Detektiran
N/A	Sveučilište u Washingtonu	*Treponema pallidum*	Heat-killed *Treponema pallidum*	Soj Nichols	Detektiran
N/A	Sveučilište u Washingtonu	*Treponema pallidum*	Heat-killed *Treponema pallidum*	soj SS14	Detektiran

Tablica 17. Kontrolni materijal za HSV-2 i *T. pallidum* od tvrtki Vircell S.L, ZeptoMetrix i Sveučilišta u Washingtonu.

Svi sojevi i referentni materijali ispravno su detektirani u odgovarajućem kanalu, a EIC je pokazao amplifikaciju s Ct vrijednošću ≤ 40.

12.4.2. Preciznost

Kako bi se odredila preciznost testa VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, provedene su analize unutar testa (ponovljivost), među testovima, među serijama i među opremom (reproducibilnost) s umjetnom matricom lezije kože s dodatkom referentnih sojeva Human herpesvirus 1, soj KOS (ATCC® VR-1493, Ref FR-310 (IRR)), Herpes Simplex Virus tip 2, soj MS (Ref, 0810006CF (Zeptometrix)) i *Treponema pallidum*, soj SS14 (Sveučilište u Washingtonu).

Intra-testna

Intra-test proveden je analizom šest replikata svih uzoraka u istom ciklusu korištenjem VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Sažetak rezultata prikazan je u donjoj tablici.

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

Tablica 18. Rezultati intra-testne ponovljivosti za VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = ciklus praga. ($\bar{x}$) = aritmetička srednja Ct vrijednost, (σ) = standardna devijacija, (CV %) = koeficijent varijacije, NEG = negativno, N/A = nije primjenjivo.

Inter-testna

Intertestno je testirano testiranjem četiri replikata različitih uzoraka u tri različita dana od strane tri različita operatera, korištenjem VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum Assay* for BD MAX™ System. Sažetak rezultata prikazan je u donjoj tablici.

Cilj	Kanal	Vrsta uzorka	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
HSV-1	475/520 (FAM)	3xLoD	33,21	0,47	1,41
		5xLoD	31,85	0,78	2,43
		Negativna kontrola	NEG	N/A	N/A
HSV-2	530/565 (HEX)	3xLoD	33,83	0,56	1,66
		5xLoD	32,68	0,48	1,48
		Negativna kontrola	NEG	N/A	N/A
EIC	585/630 (ROX)	3xLoD	29,82	0,43	1,43
		5xLoD	29,94	0,40	1,33
		Negativna kontrola	29,78	0,46	1,54
Treponema pallidum	630/665 (Cy5)	3xLoD	32,61	1,07	3,29
		5xLoD	31,86	1,24	3,88
		Negativna kontrola	NEG	N/A	N/A

Tablica 19. Inter-testni rezultati za VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = ciklus praga. ($\bar{x}$) = aritmetička srednja Ct vrijednost, (σ) = standardna devijacija, (CV %) = koeficijent varijacije, NEG = negativno, N/A = nije primjenjivo.

Među-serijska

Vrijednosti među-serijske varijabilnosti određene su sa šest replikata različitih uzoraka korištenjem tri serije VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum Assay for BD MAX™ System*. Sažetak rezultata prikazan je u donjoj tablici.

Cilj	Kanal	Vrsta uzorka	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
HSV-1	475/520 (FAM)	3xLoD	33,26	0,46	1,38
		5xLoD	33,29	0,33	1,00
		Negativna kontrola	NEG	N/A	N/A
HSV-2	530/565 (HEX)	3xLoD	30,98	0,86	2,78
		5xLoD	32,70	0,58	1,79
		Negativna kontrola	NEG	N/A	N/A
EIC	585/630 (ROX)	3xLoD	30,04	0,57	1,89
		5xLoD	30,26	0,56	1,86
		Negativna kontrola	29,97	0,69	2,31
Treponema pallidum	630/665 (Cy5)	3xLoD	33,53	0,76	2,26
		5xLoD	32,24	0,55	1,69
		Negativna kontrola	NEG	N/A	N/A

Tablica 20. Rezultati među-serijske varijabilnosti za VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = ciklus praga. ($\bar{x}$) = aritmetička srednja Ct vrijednost, (σ) = standardna devijacija, (CV %) = koeficijent varijacije, NEG = negativno, N/A = nije primjenjivo.

Među-uređajna

Vrijednosti među-uređajne varijabilnosti određene su sa šest replikata istih uzoraka korištenih za intratestne, intertestne i inter-serijske vrijednosti, korištenjem VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System i tri različita sustava BD MAX™ System. Sažetak rezultata prikazan je u donjoj tablici.

Cilj	Kanal	Vrsta uzorka	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV %
HSV-1	475/520 (FAM)	3xLoD	33,71	0,52	1,54
		5xLoD	32,68	0,59	1,79
		Negativna kontrola	NEG	N/A	N/A
HSV-2	530/565 (HEX)	3xLoD	33,56	0,80	2,39
		5xLoD	32,65	0,42	1,28
		Negativna kontrola	NEG	N/A	N/A
EIC	585/630 (ROX)	3xLoD	29,51	0,77	2,59
		5xLoD	29,23	0,39	1,33
		Negativna kontrola	29,98	0,52	1,75
Treponema pallidum	630/665 (Cy5)	3xLoD	32,28	0,62	1,93
		5xLoD	31,19	0,40	1,29
		Negativna kontrola	NEG	N/A	N/A

Tablica 21. Rezultati među-uređajne varijabilnosti za VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = ciklus praga. ($\bar{x}$) = aritmetička srednja Ct vrijednost, (σ) = standardna devijacija, (CV %) = koeficijent varijacije, NEG = negativno, N/A = nije primjenjivo.

Zaključno, studija preciznosti potvrdila je pouzdanu učinkovitost i dosljednost VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

12.4.3. Točnost

Eksperiment točnosti proveden je analizom panela iz vanjskih programa procjene kvalitete (EQA). Analizirani su uzorci koji sadrže HSV-1, HSV-2 ili *T. pallidum*, među ostalim neciljnim mikroorganizmima. Svi rezultati testova prikazani u sljedećoj tablici uspoređeni su s konačnim izvješćima koja su dostavili organizatori EQA programa.

Cilj	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)
Treponema pallidum	0,97 (0,85-0,99)	7	26	0	1	0,88 (0,47-0,99)	1 (0,87-1)

Tablica 22. Rezultati točnosti korištenjem VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (ORA) = ukupno podudaranje, (TP) = istinski pozitivan, (TN) = istinski negativan, (FP) = lažno pozitivan, (FN) = lažno negativan, (PPA) = pozitivno postotno podudaranje, (NPA) = negativno postotno podudaranje.

Zaključno, VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System pruža visoku točnost u detekciji DNA HSV-1, HSV-2 i *T. pallidum*, s izvrsnim NPA i PPA vrijednostima za sve testirane sojeve.

12.5. Analitička specifičnost i reaktivnost

Analitička specifičnost i analitička reaktivnost za VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System procijenjene su *in silico* i eksperimentalno, primjenom različitih početnih materijala kao što su certificirani referentni sojevi, certificirane referentne RNA/DNA te materijali iz programa vanjskih osiguravanja kvalitete (EQA).

12.5.1. Analitička specifičnost

Analitička specifičnost sposobnost je testa da detektira predviđenu metu. Postoje četiri komponente koje treba razmotriti za analitičku specifičnost: unakrsna reaktivnost, koinfekcija, interferencija mikrobioloških agensa i interferencija tvari. Unakrsna reaktivnost može se pojaviti kada su genetski povezani mikroorganizmi prisutni u uzorku bolesnika, dok se mikrobiološka interferencija može pojaviti ako ti genetski povezani mikroorganizmi promijene detekciju ciljanih mikroorganizama kada su prisutni. Slično tome, studija koinfekcije ima za cilj procijeniti mogu li ciljni mikroorganizmi u različitim koncentracijama u istom uzorku promijeniti detekciju između njih. Konačno, interferencija tvari može se pojaviti ako prisutnost specifičnih tvari potencijalno prisutnih u matrici uzorka utječe na učinkovitost qPCR-a.

Analiza *in silico* unakrsna reaktivnost

Unakrsna reaktivnost procijenjena je korištenjem referentnih sekvenci patogena iz NCBI Genbank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) i alata za usklađivanje kao što je BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) te internog bioinformatičkog analitičkog softvera.

Prikazani su samo rezultati sekvenci s postotkom homologije većim od 80 %. Usklađene sekvence s postotkom usklađenosti manjim od 80 % homologije smatrane su malo vjerojatnima za detekciju.

Treponema pallidum

Sve analizirane sekvence bile su ispod 80 % homologije s *T. pallidum* setom početnica i sonde.

In silico analiza unakrsne reaktivnosti pokazala je 100 % homologije s *Treponema paraluiscuniculi* (Taxid ID: 53435 i 545766). Međutim, prema pretraživanju NCBI-ja, te su sekvence pronađene kao heterotipske ili taksonomski sinonimi te također odgovaraju *Treponema pallidum*.

Stoga nijedna od analiziranih sekvenci, uključujući one koje pokazuju homologiju veću od 80 %, ne može utjecati na ispravnu detekciju *Treponema pallidum*.

Humani alfaherpesvirus 1

Sve analizirane sekvence bile su ispod 80 % homologije s HSV-1 setom početnica i sonde.

In silico analiza unakrsne reaktivnosti pokazala je 98,33 % homologije s alfa-1 herpesvirusom čimpanze soj 105640 (Taxid ID: 332937). Domaćin ovog soja alfaherpesvirusa je čimpanza (*Pan troglodytes*). Herpesvirusi su vrlo specifični za domaćina i dijele dugu sinkronu evoluciju sa svojim domaćinima. Taj virus nije identificiran u ljudi i za sada se ne smatra zoonotskim virusom, stoga ne ometa detekciju koronavirusa virusa HSV-1.

Stoga nijedna od analiziranih sekvenci, uključujući one koje pokazuju homologiju veću od 80 %, ne može utjecati na ispravnu detekciju virusa HSV-1.

Humani alfaherpesvirus 2

Sve analizirane sekvence bile su ispod 80 % homologije s HSV-2 setom početnica i sonde.

Zaključno, ciljni dizajni za HSV-1, HSV-2 i *T. pallidum* testa VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System ne bi trebali uzrokovati lažno pozitivne rezultate u detekciji *Treponema pallidum*, humanog alfaherpesvirusa 1 i humanog alfaherpesvirusa 2 kada su prisutni drugi organizmi.

Analitička specifičnost eksperimentalno ispitivanje

Eksperimentalno ispitivanje unakrsne reaktivnosti

Unakrsna reaktivnost testa VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System potvrđena je testiranjem panela različitih mikroorganizama povezanih sa simptomima spolno prenosivih infekcija ili ekološki i filogentski relevantnih mikroorganizama. Kada je to bilo moguće i kada su bili dostupni podaci o koncentraciji, interferirajući mikroorganizmi ocijenjeni su na medicinski relevantnim razinama (obično 1E+05 – 1E+06 cfu (jedinica koja formira koloniju)/ml za bakterije/gljivice i 1E+04 – 1E+05 pfu (jedinica koja formira plak)/ml za viruse). Nije zabilježena unakrsna reaktivnost između bilo kojih od sljedećih testiranih mikroorganizama, izuzev za ciljne mikroorganizme.

Testiranje unakrsne reaktivnosti					
Acinetobacter baumannii 5377 [NCDC KC 755]	-	*Haemophilus influenzae* soj L-378	-	*Listeria monocytogenes* serovar 4b	-
Aspergillus fumigatus Fresenius 1863 CECT 2071	-	Hepatitis A HM175/18f	-	Virus majmunskih boginja	-
Atopobium vaginae	-	Herpes Simplex Virus type-1 1st WHO IS for HSV-1	+	*Mycoplasma genitalium* soj M30	-
Bacteroides fragilis	-	Herpes Simplex Virus type-2 1st WHO IS for HSV-2	+	*Mycoplasma hominis* soj LBD-4	-
Candida albicans	-	Herpes virus 2 soj MS	+	*Neisseria gonorhoeae* soj NCTC 8375 [B 5025]	-
Candida glabrata	-	Human Herpesvirus 1 HF soj	+	*Neisseria meningitidis* soj M2091	-
Candida krusei Issatchenkia orientalis Kudryavtsev 1960 CECT 1433	-	Human Herpesvirus 1 Soj F	+	*Proteous mirabilis* NCDC 2059-70	-
Candida parapsilosis	-	Human Herpesvirus 1 soj KOS (ATCC-VR-1493)	+	*Pseudomonas aeruginosa* soj RH 815	-
Candida tropicalis (Castellani) Berkhout 1923 CECT 1005	-	Human Herpesvirus 1 soj MacIntyre	+	*Serratia marcescens* subsp. marcescens	-
Chlamydia trachomatis serovar E	-	Human Herpesvirus 2 soj ATCC-2011-2	+	*Staphylococccus aureus* subsp. Aureus, soj Seattle 1945	-
Citrobacter freundii	-	Human Herpesvirus 2 soj G	+	*Stenotrophomonas maltophilia* soj 810-2	-
Enterobacter cloacae subsp. cloacae	-	Humani papiloma virus 16	-	*Treponema pallidum* DNA Control, Vircell	+
Enterococcus faecalis tip soj CECT 8120	-	Humani papiloma virus 18	-	*Treponema pallidum* soj Nichols	+
Enterococcus faecium vanA, soj CECT 5253	-	*Klebsiella oxytoca* soj MIT 10-5243	-	*Treponema pallidum* soj SS14	+
Epstein-Barr Virus 1st WHO IS for Epstein-Barr Virus EBV	-	*Klebsiella pneumoniae* soj UHKPC57	-	*Trichomonas vaginalis*, QCMD TV18S-01	-
Escherichia coli tip soj	-	*Listeria innocua*	-	*Ureaplasma urealyticum* T-soj 960 (CX8) [960, CIP 103755, NCTC 10177]	-
Gardnerella vaginalis 594 [NCTC 10287]	-	*Listeria ivanovii* subsp. londoniensis	-	Varicella Zoster Virus soj Ellen	-
Haemophilus ducreyi klasa I	-	*Listeria monocytogenes* serovar 1/2	-		

Tablica 23. Referentni patogeni mikroorganizmi uključeni u test unakrsne reaktivnosti. Rezultat + ili – odnosi se na pozitivni ili negativni rezultat dobiven u različitim kanalima ovisno o detektiranom cilju. Ako je testirani mikroorganizam jedan od ciljeva koje detektira uređaj, dobiva se pozitivni rezultat u odgovarajućem kanalu, ali negativni rezultat u ostalim kanalima.

Zaključno, rezultati testova unakrsne reaktivnosti ukazuju na visoku specifičnost testa VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, čime se minimizira rizik od lažno pozitivnih rezultata. Budući da nisu uočene nespecifične amplifikacije s drugim povezanim mikroorganizmima, to sugerira da je uređaj sposoban precizno razlikovati ciljeve.

Studija koinfekcije

Studija koinfekcije provedena je korištenjem humanog herpesvirusa 1, soj KOS (ATCC® VR-1493, Ref FR-310 (IRR)), virusa Herpes Simplex tipa 2, soj MS (Ref, 0810006CF (Zeptometrix)) i *Treponema pallidum*, soj SS14 (Sveučilište u Washingtonu) u različitim koncentracijama, kako bi se potvrdilo da prisutnost bilo kojeg od njih, neovisno o koncentraciji, ne mijenja detekciju između njih. Analizirano je tri negativnih uzoraka prirodne matrice kožnih lezija s dodatkom referentnog materijala, pri čemu je jedan cilj bio u niskoj koncentraciji (3xLoD), a ostali ciljevi u vrlo visokoj koncentraciji, obično 1E+04 – 1E+05 jedinica/ml, ako je bilo moguće.

Rezultati potvrđuju da detekcija ciljanih mikroorganizama nije promijenjena kada se analizira s VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System u koinfekciji pri različitim koncentracijama.

Studija interferirajućih mikrobioloških agensa

Provedena je studija mikrobne interferencije kako bi se analizirali potencijalno interferirajući mikrobiološki agensi za VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Testiran je panel različitih mikroorganizama od kliničkog, okolišnog i filogenetskog značaja u prisutnosti ciljeva HSV-1, HSV-2 i *T. pallidum* koristeći negativnu matricu prirodnih kožnih lezija s dodatkom Human herpesvirus 1, soj KOS (ATCC® VR-1493, Ref FR-310 (IRR)), Herpes Simplex Virus tip 2, soj MS (Ref, 0810006CF (Zeptometrix)) i *Treponema pallidum*, soj SS14 (Sveučilište u Washingtonu). Kada je to bilo moguće i kada su bili dostupni podaci o koncentraciji, interferirajući virusi, bakterije i/ili gljivice ocijenjeni su na medicinski relevantnim razinama (obično 1E+05 – 1E+06 cfu/ml za bakterije/gljivice i 1E+04 – 1E+05 pfu/ml za viruse).

Pozitivna kontrola matrice (Positive Matrix Control, PMC) i negativna kontrola matrice (Negative Matrix Control, NMC) uključene su kao kontrole testa. PMC odgovara negativnoj matrici s dodatkom specifičnih ciljnih sojeva bez ikakvih interferirajućih mikrobnih agensa, dok NMC odgovara negativnoj matrici bez ikakvih interferirajućih mikrobnih agensa.

Naziv mikroorganizma	Testirana koncentracija	Rezultat
PMC	N/A	N.I
NMC	N/A	N.I
Aspergillus fumigatus	Nije dostupno	N.I
Atopobium vaginae	4,52E+03 cfu/µl	N.I
Candida albicans	4,18E+03 cfu/µl	N.I
Candida glabrata	2,46E+03 cfu/µl	N.I
Candida parapsilosis	Nije dostupno	N.I
Candida tropicalis	3,04E+04 kop/µl	N.I
Chlamydia trachomatis serovar E	3,20E+06 IFU/ml	N.I
Enterobacter cloacae	1,28E+03 cfu/µl	N.I
1st WHO IS for Epstein-Barr Virus EBV	5,00E+04 IU/ml	N.I
Gardnerella vaginalis 594 [NCTC 10287]	4,40E+05 cfu/ml	N.I
Haemophilus ducreyi klasa I	1,40E+02 kop/µl	N.I
Haemophilus influenzae	1,20E+03 cfu/µl	N.I
Hepatitis A	2,80E+03 TCID50/µl	N.I
Klebsiella oxytoca	Nije dostupno	N.I
Klebsiella pneumoniae	Nije dostupno	N.I
Listeria innocua	Nije dostupno	N.I
Listeria ivanovii subsp. londoniensis	Nije dostupno	N.I
Listeria monocytogenes (CECT 4031)	2,90E+03 cfu/µl	N.I
Listeria monocytogenes (CECT 935)	2,70E+03 cfu/µl	N.I
Mycoplasma hominis	4,40E+03 cfu/µl	N.I
Mycoplasma genitalium	3,80E+03 cfu/µl	N.I
Neisseria gonorhoeae	6,20E+03 cfu/µl	N.I

Neisseria meningitidis	5,70E+04 cfu/µl	N.I
Pseudomonas aeruginosa	4,90E+04 cfu/µl	N.I
Staphylococccus aureus	4,60E+04 cfu/µl	N.I
Stenotrophomonas maltophilia	9,20E+03 cfu/µl	N.I
Ureaplasma urealyticum	2,00E+04 cfu/µl	N.I
Acinetobacter baumannii 5377 [NCDC KC 755]	8,10E+05 cfu/ml	N.I
Bacteroides fragilis	3,40E+02 kop/µl	N.I
Enterococcus faecalis tip soj	5,00E+05 cfu/ml	N.I
Enterococcus faecium vanA	3,50E+05 cfu/ml	N.I
Humani papiloma virus 16	1,00E+03 IU/µl	N.I
Humani papiloma virus 18	1,00E+03 IU/µl	N.I
Serratia marcescens	2,30E+05 cfu/ml	N.I
Varicella-Zoster Virus	7,26E+04 cfu/ml	N.I
Citrobacter freundii tip soj	6,20E+02 cfu/µl	N.I
Escherichia coli tip soj	5,20E+02 cfu/µl	N.I
Proteous mirabilis	2,55E+01 cfu/µl	N.I
Virus majmunskih boginja	1,50E+03 kop/µl	N.I

Tablica 24. Test na interferirajuće mikrobne agense. N.I. = Nema interferencije, (PMC) = pozitivna kontrola matrice, (NMC) = negativna kontrola matrice, (TCID50): Infektivna doza za 50 % stanične kulture (TCID50), (IU): međunarodne jedinice (IU): (cfu): jedinice koje formiraju kolonije, (kop): kopije, (IFU): jedinica infekcije.

Zaključno, nije uočena interferencija u detekciji ciljne nukleinske kiseline s bilo kojim testiranim mikroorganizmima.

Studija interferirajućih tvari

Provedena je studija interferirajućih tvari kako bi se testirao potencijalno interferirajući učinak endogenih i egzogenih tvari za VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Ukupno 22 potencijalno interferirajuće tvari dodane su negativnoj matrici prirodnih kožnih lezija obogaćenoj referentnim sojevima: Human herpesvirus 1, soj KOS (ATCC® VR-1493, Ref FR-310 (IRR)), Herpes Simplex Virus tip 2, soj MS (Ref, 0810006CF (Zeptometrix)) i *Treponema pallidum*, soj SS14 (Sveučilište u Washingtonu); te su procijenjene sa šest replikata.

Pozitivna kontrola matrice (Positive Matrix Control, PMC) i negativna kontrola matrice (Negative Matrix Control, NMC) uključene su kao kontrole testa. PMC odgovara negativnoj matrici s dodatkom specifičnih ciljnih sojeva bez ikakvih interferirajućih tvari, dok NMC odgovara negativnoj matrici bez interferirajućih tvari i bez dodanih mikroorganizama/referentnog materijala. Dobiveni su sljedeći rezultati:

Naziv tvari	Testirana koncentracija	Rezultat
PMC	N/A	N.I.
NMC	N/A	N.I.
Aciklovir	6,60E-02 mg/ml	N.I.
Albumin	1,00E+01mg/ml	N.I.
Puna krv	1,00E+00 % (v/v)	N.I.
Leukociti/monociti	1,00E+06 stanica/ml	N.I.
Mucin	2,50E+00 mg/ml	N.I.

Clamiox (hidrokortizon)	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Neosayomol (difenhidramin)	3,87E-02 mg/ml	N.I.
Letibalm (balzam za usne)	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Kazein	7,00E+00mg/ml	N.I.
Hemoal (benzokain)	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Durex Frescor	5,00E+01 µl/ml	N.I.
SOIVRE Intim Oil	5,00E+01 µl/ml	I
	1,25E+01 µl/ml	N.I.
Liade	7,20E+00 mg/ml	N.I.
Ženski urin	1,00E+01 % (v/v)	N.I.
Muški urin	1,00E+01 % (v/v)	N.I.
Feces	2,20E-01 % (v/v)	N.I.
Sjemena tekućina	5,00E+00 % (v/v)	N.I.
Halibut	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Vagisil krema	7,50E-01 mg/ml	N.I.
Kukuruzni škrob	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.
Tiokonazol	2,50E+00 mg/ml	N.I.

Tablica 25. Potencijalne interferirajuće tvari. N.I: Nema prijavljene interferencije / I: Interferencija.

Na VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System testirane su različite potencijalno interferirajuće tvari, endogene i egzogene. Interferencija je uočena tijekom ispitivanja SOIVRE Intim Oil pri 50 µl/ml i Talquistina pri 2,64 % (v/v). Provedena su razrjeđivanja sve dok se nije postigla koncentracija pri kojoj više nisu uočeni ti interferirajući učinci: 12,5 µl/ml za SOIVRE Intim Oil i 0,17 % (v/v) za Talquistina. Dobiveni rezultati navode na zaključak da pri konačnim koncentracijama koje su testirane nije uočena interferencija bilo koje od ocijenjenih tvari.

12.5.2. Analitička reaktivnost

Analitička reaktivnost može se definirati kao postotak ciljnih sojeva mikroba ili uzoraka DNA/RNA koji daju ispravan pozitivni rezultat. Analitička reaktivnost proučavana je *in silico* i eksperimentalna ispitivanja.

Analiza *in silico* analitičke reaktivnosti

Analitička reaktivnost VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System procijenjena je korištenjem javno dostupne baze podataka o nukleotidnim sekvencama kao što je NCBI GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) i internog softvera za bioinformatičku analizu kako bi se pokazalo da se ciljni geni mogu ispravno detektirati ispitivanim proizvodom. *In silico* analiza dizajna početnica i sonde provedena je kroz usklađivanje s ukupno 4941 analiziranom sekvencom (sekvence preuzete iz baze podataka s uklonjenim duplikatima) za *T. pallidum*, 9779 za HSV-1 i 8689 za HSV-2. Dobiveni rezultati prikazani su u sljedećoj tablici:

Treponema pallidum					
Gen	**Usklađene sekvence: 607**				
	Bez nepodudaranja	**S nepodudaranjem**	**Sekvence s potvrđenom detekcijom**	**Sekvence bez detekcije**	**Sekvence s nepoznatom detekcijom**
16S rRNA	99,84 %	0,16 %	99,84 %	0 %	0,16 %
Humani alfaherpesvirus 1					
Gen	**Usklađene sekvence: 513**				
	Bez nepodudaranja	**S nepodudaranjem**	**Sekvence s potvrđenom detekcijom**	**Sekvence bez detekcije**	**Sekvence s nepoznatom detekcijom**
UL1	87,33 %	12,67 %	97,66 %	0 %	2,34 %
Humani alfaherpesvirus 2					
Gen	**Usklađene sekvence: 549**				
	Bez nepodudaranja	**S nepodudaranjem**	**Sekvence s potvrđenom detekcijom**	**Sekvence bez detekcije**	**Sekvence s nepoznatom detekcijom**
US4	93,44 %	6,56 %	93,44 %	0 %	6,56 %

Tablica 26. Test analitičke reaktivnosti *in silico*. „Usklađene sekvence" = broj usklađenih sekvenci bez ili s nepodudaranjem iz ukupnog broja analiziranih sekvenci, „Sekvence s potvrđenom detekcijom" = sekvence bez nepodudaranja ili mokro testirane sekvence čija je detekcija zajamčena, „Sekvence bez detekcije" = sekvence prethodno *in silico* analizirane čija se eksperimentalna detekcija ne može zajamčiti zbog prethodnih negativnih eksperimentalnih dokaza, „Sekvence s nepoznatom detekcijom" = sekvence prethodno *in silico* analizirane čija se eksperimentalna detekcija ne može zajamčiti zbog nedostatka eksperimentalnih dokaza.

Ukratko, analiza inkluzivnosti pokazala je ispravnu detekciju gena *16S rRNA, UL1* i *US4* bakterije *T. pallidum*, virusa HSV-1 i HSV-2, redom,, s VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

Eksperimentalno ispitivanje analitičke reaktivnosti

Analitička reaktivnost VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System za HSV-1 procijenjena je prema DNA iz Human Herpesvirus 1, HF soj (ATCC kod VR-260), Human Herpesvirus 1, soj MacIntyre (ATCC kod VR-539), Human Herpesvirus 1, soj F (ATCC kod VR-733) i 1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-1 (HSV-1) (NIBSC 16/368), pokazujući pozitivne rezultate.

Analitička reaktivnost VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System za HSV-2 procijenjena je prema DNA iz Human Herpesvirus 2, soj G (ATCC kod VR-3393), Human Herpesvirus 2, soj ATCC-2011-2 (ATCC kod VR-1779) i 1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-2 (HSV-2) (NIBSC 17/122), pokazujući pozitivne rezultate.

Analitička reaktivnost VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System za *T. pallidum* procijenjena je prema DNA iz *Treponema pallidum*, soj Nichols (Sveučilište u Washingtonu) i *Treponema pallidum* DNA Control (Vircell MBC109), pokazujući pozitivne rezultate.

12.6. Metrološka sljedivost

Ovaj test nije osmišljen u svrhe mjerenja.

13. Značajke kliničke učinkovitosti

Klinička učinkovitost VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System testirana je na brisevima anogenitalnih i oralnih kožnih lezija koje je prikupilo medicinsko osoblje koristeći Copan eSwab®. Za prikupljanje je sterilni bris (FLOQSwab) stavljen u priloženu bočicu koja sadrži 1 ml Copan's Liquid Amies Elution Swab. Dobiveni su sljedeći rezultati:

	Centar	Vrsta uzorka	Hodogram	Cilj
1	Certest Biotec S.L. (Zaragoza, Španjolska) u suradnji s Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza, Španjolska) koristeći uzorke iz Biobanco del Sistema de Salud de Aragón (BSSA)	Bris anogenitalne i oralne kožne lezije (retrospektivna studija)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 + BD MAX™ System	HSV-1
				HSV-2
				T. pallidum
2	Certest Biotec S.L. (Zaragoza, Španjolska) koristeći uzorke iz Cerba Xpert	Bris anogenitalne i oralne kožne lezije (retrospektivna studija)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 + BD MAX™ System	HSV-1
				HSV-2
				T. pallidum

Tablica 27. Mjesto, vrsta uzorka, radni proces i cilj.

Izračunate su istinski pozitivne i negativne vrijednosti, lažno pozitivne i negativne vrijednosti, vrijednosti, osjetljivost, specifičnost, pozitivne prediktivne vrijednosti (PPV), negativne prediktivne vrijednosti (NPV) i omjeri vjerojatnosti (LR) za VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Rezultati i analize različitih studija objedinjeni su kao jedna referentna vrijednost jer su obje studije koristile istu referentnu metodu, isti tip uzoraka i iste kriterije uključivanja/isključivanja. Rezultati su prikazani u sljedećoj tablici:

Centar	Analiza usporednog lijeka	Cilj	TP	TN	FP	FN	Osjetljivost	Specifičnost	PPV	NPV	LR+	LR-
1+2	Allplex™ Genital Ulcer Assay (Seegene)	HSV-1	50	96	0	1	0,98 (0,90 – 1)	1 (0,96 – 1)	1 (0,93 – 1)	0,99 (0,94 – 0,99)	188,4 (11,86 – 2992)	0,029 (0,006 – 0,14)
		HSV-2	49	97	0	1	0,98 (0,89 – 0,99)	1 (0,96 – 1)	1 (0,93 – 1)	0,99 (0,94 – 0,99)	190,2 (11,98 – 3021)	0,03 (0,006 – 0,14)
		T. pallidum	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)

Tablica 28. Istinski pozitivne (TP) i negativne (TN) vrijednosti, lažno pozitivne (FP) i lažno negativne (FN) vrijednosti, osjetljivost, specifičnost, pozitivne prediktivne vrijednosti (PPV), negativne prediktivne vrijednosti (NPV) i omjeri vjerojatnosti (LR) za VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

Zaključno, rezultati pokazuju visoku podudarnost za detekciju HSV-1, HSV-2 i *T. pallidum* korištenjem VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

Literatura

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

Radolf, J. D., Deka, R. K., Anand, A., Šmajs, D., Norgard, M. V, & Yang, X. F. (2016). Treponema pallidum, the syphilis spirochete: making a living as a stealth pathogen HHS Public Access. *Nat Rev Microbiol*, *14(12)*, 744–759. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.141

Tudor, M. E., Al Aboud, A. M., & Gossman, W. (2022, July 23). *Syphilis*. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL); StatPearls Publishing. https://doi.org/10.1016/j.med.2022.04.001

WHO. (2023). *Herpes Simplex Virus*. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus

Zhu, S., & Viejo-Borbolla, A. (2021). Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence*, *12*(1), 2670–2702. https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1982373

Simboli za IVD komponente i reagense

IVD	*In vitro* dijagnostički uređaj		Čuvati na suhom		Rok valjanosti		Proizvođač	LOT	Šifra serije
	Pogledajte upute za uporabu		Ograničenje temperature	Σ	Sadržaj dovoljan za <n> test(ova)	UDI	Jedinstveni identifikacijski broj uređaja	REF	Kataloški broj
CE	CE oznaka		Držite podalje od sunčeve svjetlosti						

Robni žigovi

BD MAX™ je registrirani zaštitni znak kompanije Becton, Dickinson and Company.

Zadržana prava na promjenu. Sva prava pridržana. © Certest Biotec, S.L.

Svi drugi robni žigovi koji se mogu pojaviti u ovoj uputi o lijeku vlasništvo su njihovih vlasnika.

Certest Biotec, S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1, 50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Španjolska)
Tel. (+34) 976 520 354|viasure@certest.es|www.certest.es

Podaci o australskom naručitelju: Becton Dickinson Pty Ltd., 66 Waterloo Road. Macquarie Park NSW 2113, Australija

Podaci o novozelandskom naručitelju: Becton Dickinson Limited, 14B George Bourke Drive. Mt. Wellington Auckland 1060, Novi Zeland

Kontrola promjene		
Verzija br.	**Promjene**	**Datum**
00	Izvorna verzija Ova verzija je prijevod izvornog dokumenta engleski: IUo-444222en0725.00.	27.7.2025.

Tablica A 2. Tablica kontrole promjene.

Revizija: 00

VIASURE
by certest

Certest Biotec, S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1 50840,
San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
(+34) 976 520 354
viasure@certest.es
www.certest.es

certest

F-566 rev.03

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