

Real Time PCR Detection Kit

HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum Assay
for BD MAX™ System
Istruzioni per l'uso

CE IVD
2797

Le presenti istruzioni per l'uso si applicano ai seguenti riferimenti:

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

Tabella A1. Codice del prodotto da usare con 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 selecta limba necesară. Pentru informații suplimentare, contactați: viasure@certest.es.

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

SK Ak si chcete stiahnuť IFUS v iných jazykoch, prejdite na stránku **certest.es/viasure/labeling**. 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.

Se la propria lingua non è presente nell'elenco, consultare il sito web **certest.es/viasure/labeling**. Se la propria lingua non è presente sul sito web, contattare viasure@certest.es.

Nota: l'utilizzatore deve segnalare al produttore e alle autorità competenti dello Stato membro in cui si trova come utilizzatore e/o paziente qualunque grave incidente relativo al prodotto.

Contenuto

1.	Scopo previsto	6
2.	Introduzione e spiegazione	6
3.	Principio della procedura	7
4.	Reagenti forniti	8
5.	Reagenti e strumenti necessari e non inclusi	8
6.	Condizioni di trasporto, conservazione e utilizzo	9
7.	Precauzioni per gli utilizzatori	10
8.	Procedura di test	12
8.1.	Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni	12
8.2.	Preparazione del campione ed estrazione del DNA	13
8.3.	Protocollo PCR	13
8.3.1.	Creazione del programma di test PCR per VIASURE <i>HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum</i> Assay for BD MAX™ System	13
8.3.2.	Preparazione della griglia BD MAX™	17
8.3.3.	Configurazione dello strumento BD MAX™	18
8.3.4.	Report dei risultati di BD MAX™	19
9.	Interpretazione dei risultati	19
10.	Limiti del test	21
11.	Controllo di qualità	23
12.	Caratteristiche di prestazione analitica	23
12.1.	Linearità analitica	23
12.2.	Sensibilità analitica	24
12.2.1.	Limite del bianco (LoB)	24
12.2.2.	Limite di rivelabilità (LoD)	25
12.3.	Intervallo di misurazione	25
12.4.	Accuratezza	25
12.4.1.	Esattezza	25
12.4.2.	Precisione	27

12.4.3. Accuratezza	29
12.5. Specificità analitica e reattività analitica	30
12.5.1. Specificità analitica	30
12.5.2. Reattività analitica	36
12.6. Tracciabilità metrologica	37
13. Caratteristiche di prestazione clinica	37
Bibliografia.....	39
Simboli per reagenti e componenti IVD	40
Marchi commerciali.....	40

ITALIANO

1. Scopo previsto

VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System è un test qPCR automatizzato progettato per il rilevamento qualitativo simultaneo del DNA del virus Herpes simplex 1 (HSV-1), del virus Herpes simplex 2 (HSV-2) e del *Treponema pallidum* (sifilide) in campioni di tamponi di lesioni cutanee anogenitali e orali di pazienti con sospetta infezione da HSV-1, HSV-2 e *T. pallidum* secondo il parere del loro medico (HCP). L'uso previsto di questo test è quello di facilitare la diagnosi di infezione con i microorganismi succitati in combinazione con i segni clinici e i sintomi del paziente e/o i fattori di rischio epidemiologico. I risultati positivi indicano la presenza di un target di acidi nucleici (NA), ma non escludono la presenza di altri patogeni non rilevati dal test. I risultati negativi non escludono la presenza dei target di NA e non devono essere usati come unica base per il trattamento o per altre decisioni riguardanti la gestione del paziente. Questo test utilizza BD MAX™ System per l'estrazione automatizzata del DNA e la successiva qPCR avvalendosi dei reagenti forniti in combinazione con i reagenti universali e i materiali di consumo per BD MAX™ System. Il DNA viene estratto da campioni, amplificato mediante test qPCR e identificato mediante primer specifici e sonde marcate con un colorante fluorescente per HSV-1, HSV-2 e *T. pallidum*.

Il prodotto deve essere utilizzato da personale di laboratorio clinico qualificato e addestrato, specificamente istruito e formato riguardo a tecniche di PCR in tempo reale e procedure diagnostiche *in vitro*; la formazione deve includere anche lo strumento di PCR in tempo reale (termociclatore) e il sistema di estrazione degli acidi nucleici.

2. Introduzione e spiegazione

Il virus Herpes simplex (HSV) umani di tipo 1 e 2 sono due dei virus umani più diffusi a livello mondiale, comunemente associati a malattie come l'herpes labiale, l'herpes genitale, la cheratite stromale da herpes, la meningite e l'encefalite (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). L'HSV colpisce principalmente la pelle e le mucose, causando infezioni persistenti caratterizzate da periodi di quiescenza (latenza) e malattia ricorrente (riattivazione) (Cole, 2020; Minaya et al., 2017). La trasmissione dell'HSV-1 e dell'HSV-2 avviene attraverso il contatto orale, mentre le infezioni da HSV-2 si verificano in seguito, normalmente attraverso la trasmissione sessuale, e le manifestazioni cliniche di questi virus sono altamente variabili: asintomatiche, lievi o potenzialmente letali (Cole, 2020; WHO, 2023; Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). Nella maggior parte degli individui immunocompetenti, l'HSV causa una malattia lieve e che si risolve spontaneamente (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). Tuttavia, l'infezione da HSV è anche associata a un'elevata morbilità e mortalità in alcuni soggetti, come i pazienti immunocompromessi che soffrono di infezione ricorrente da HSV (Cole, 2020; Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). È stato osservato che l'infezione causata da un tipo di HSV tipicamente genera un'immunità che previene la reinfezione con lo stesso sierotipo, ma non con l'altro (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021).

La spirocheta *Treponema pallidum* è riconosciuta come l'agente eziologico di: sifilide venerea, framboesia, sifilide endemica e pinta, tutte infezioni a più stadi che possono essere distinte solo in base a criteri clinici, epidemiologici e geografici (Mercuri et al., 2022; Peeling et al., 2023; Radolf et al., 2016; Tudor et al., 2022). Il *T. p. pertenue* è associato alla framboesia, il *T. carateum* alla pinta e il *T. p. endemicum* alla sifilide endemica, mentre il *T. pallidum* sottospecie *pallidum* è l'unica sottospecie legata alla sifilide venerea (Mercuri et al., 2022; Tudor et al., 2022).

La sifilide progredisce attraverso più stadi, ciascuno dei quali presenta segni e sintomi distinti, come sifilomi nella sifilide primaria ed eruzioni cutanee o ulcere nella sifilide secondaria (CDC, 2023; Mercuri et al., 2022; Peeling et al., 2023). Infatti, a causa della molteplicità di manifestazioni cliniche, la sifilide è denominata "la grande imitatrice" (Peeling et al., 2023; Tudor et al., 2022). Questa malattia ha colpito varie popolazioni a rischio nel corso della storia e, sebbene sia stata praticamente debellata nel 1998, la sua incidenza è aumentata dal 2000 (Mercuri et al., 2022).

È sempre consigliabile eseguire un test per differenziare l'HSV-1 dall'HSV-2, poiché ciò influisce sia sulla prognosi che sulla gestione. Il centro CDC raccomanda di confermare la diagnosi clinica con test sierologici e virologici specifici per tipo (Cole, 2020). Un metodo di laboratorio affidabile per la diagnosi delle infezioni genitali acute da HSV è il rilevamento del DNA dell'HSV-1 e dell'HSV-2 mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) (Cole, 2020). Per quanto riguarda il *T. pallidum*, il rilevamento diretto e i test sierologici sono stati utilizzati per la diagnosi di laboratorio, poiché questo patogeno non può essere coltivato (Forrestel et al., 2020). Tuttavia, i test sierologici non sono in grado di distinguere la sifilide da altre infezioni treponemiche a causa dell'elevata somiglianza genetica tra i treponemi patogeni (Forrestel et al., 2020). Le tecniche di amplificazione degli acidi nucleici, come la PCR, consentono il rilevamento del DNA batterico nei campioni clinici nelle fasi iniziali della malattia, offrendo una potenziale strategia per il controllo dell'epidemia di sifilide grazie alla loro elevata sensibilità (Peeling et al., 2023).

3. Principio della procedura

VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System è progettato per il rilevamento qualitativo simultaneo del DNA del virus Herpes simplex 1 (HSV-1), del virus Herpes simplex 2 (HSV-2) e del *Treponema pallidum* (sifilide) in campioni di tamponi di lesioni cutanee anogenitali e orali. Una volta isolato il DNA, l'identificazione di HSV-1, HSV-2 e *T. pallidum* viene effettuata mediante l'amplificazione di una regione conservata del gene della *glicoproteina L UL1* dell'HSV-1, del gene della *glicoproteina G US4* dell'HSV-2 e del gene *16S rRNA* del *T. pallidum*, utilizzando primer specifici e sonde marcate a fluorescenza.

VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System si basa sull'attività esonucleasica 5' della DNA polimerasi. Durante l'amplificazione del DNA, questo enzima idrolizza la sonda legata alla sequenza complementare di DNA, separando il quencher dal marcatore. Questa reazione genera un'amplificazione del segnale fluorescente che è proporzionale alla quantità di template target. Questa fluorescenza viene misurata sul sistema BD MAX™.

VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System contiene in ciascuna provetta tutti i componenti necessari per un test di PCR in tempo reale (sonde/primer specifici, dNTPs, tampone, polimerasi) in un formato stabilizzato¹, oltre a un controllo interno endogeno (EIC) (gene *RNAse P umano*) per controllare l'integrità del campione, monitorare il processo di estrazione e/o escludere l'inibizione dell'attività della polimerasi. I geni costitutivi umani sono coinvolti nel mantenimento di base delle cellule e, pertanto, ci si aspetta che siano presenti in tutte le cellule umane nucleate e che mantengano livelli di espressione relativamente costanti.

Target	Canale	Gene
HSV-1	475/520	Gene della <i>glicoproteina L UL1</i>
HSV-2	530/565	Gene della <i>glicoproteina G US4</i>
<i>T. pallidum</i>	630/665	Gene <i>16S rRNA</i>
Controllo interno endogeno (EIC)	585/630	<i>RNAse P</i>

Tabella 1. Target, canale e geni.

4. Reagenti forniti

VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System include i seguenti materiali e reagenti illustrati nella Tabella 2:

Reagente/Materiale	Descrizione	Intervallo di concentrazione	Codice	Quantità
<i>HSV-1</i> , <i>HSV-2</i> & <i>Treponema pallidum</i> reaction tube	Lioprotettori e stabilizzatori	±6 g/100 mL*	Sigillo 1E	2 confezioni da 12 provette trasparenti
	Nucleotidi trifosfato (dNTPs)	±1 mM*		
	Primer e sonde	0,2-1 nMol/μL*		
	Enzimi	10-100 U/reaz.*		
Rehydration Buffer tube	Miscela di soluzione fisiologica	±13 mM	Sigillo 11	1 confezione da 24 provette trasparenti
	Tampone (TRIS, pH)	±67 mM		

Tabella 2. Reagenti e materiali forniti con VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System con Cat. N. 444222.

*Per i componenti in formato stabilizzato, l'intervallo di concentrazione è inteso post-reidratazione.

5. Reagenti e strumenti necessari e non inclusi

Nel seguente elenco sono riportati i materiali necessari per l'uso e non inclusi in VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

- Strumento per PCR in tempo reale: BD MAX™ System (Cod.: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Cod.: 442827 o 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Cod.: 437519).

¹Si prega di notare che i termini "stabilizzato" e "liofilizzato" sono utilizzati in modo identico e come sinonimi in tutto il documento.

- Vortex.
- Micropipette (tra i 2 e i 1000 µL).
- Acqua priva di nucleasi.
- Punte con filtro.
- Guanti monouso privi di talco.

Opzionale:

- I materiali del controllo esterno possono essere utilizzati nell'ambito della procedura di controllo di qualità del test. I materiali di controllo disponibili in commercio e/o i campioni precedentemente caratterizzati come positivi o negativi possono essere utilizzati come controllo positivo esterno (EPC) o controllo negativo esterno (ENC), rispettivamente. La selezione e la validazione di EPC ed ENC devono essere effettuate in conformità con le normative locali, statali e/o federali applicabili e con le procedure standard di controllo di qualità del laboratorio. Inoltre, quando si utilizzano materiali di controllo disponibili in commercio, l'utilizzatore deve attenersi alle relative istruzioni per l'uso.

6. Condizioni di trasporto, conservazione e utilizzo

- I kit possono essere trasportati e conservati a 2-30 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del kit.
- Onde evitare versamenti di liquido, evitare vibrazioni durante il trasporto.
- Dopo l'apertura delle confezioni in alluminio che contengono le provette di reazione, il prodotto può essere utilizzato fino a un massimo di 28 giorni a 2-30 °C. Conservare la fiala al riparo dalla luce.

La tabella seguente riepiloga le condizioni generali di trasporto, conservazione e utilizzo del kit e di ciascun componente:

Componente	Condizioni di trasporto	Condizioni di conservazione	Condizioni di utilizzo
Kit completo VIASURE <i>HSV-1</i> , <i>HSV-2</i> & <i>Treponema pallidum</i> Assay for BD MAX™ System	2-30 °C durante il periodo di conservazione indicato sull'etichetta del kit.	Prima dell'uso: 2-30 °C durante il periodo di conservazione indicato sull'etichetta del kit.	<i>*Fare riferimento alla condizioni di utilizzo di ciascun componente.</i>
<i>HSV-1</i> , <i>HSV-2</i> & <i>Treponema pallidum</i> reaction tube (sigillo 1E)		Prima dell'uso: 2-30 °C durante il periodo di conservazione indicato sull'etichetta del kit. Dopo apertura della confezione con gel di silice: 2-30°C fino a 28 giorni.	Temperatura ambiente.
Rehydration Buffer tube		Prima dell'uso: 2-30 °C durante il periodo di conservazione indicato sull'etichetta del kit. Dopo apertura della confezione con gel di silice: 2-30°C fino a 28 giorni.	Temperatura ambiente.

Tabella 3. Riepilogo delle condizioni di trasporto, conservazione e utilizzo di VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System e di ciascun componente.

7. Precauzioni per gli utilizzatori

- Il prodotto è destinato all'uso di personale di laboratorio clinico qualificato e addestrato, con una specifica formazione nell'esecuzione di tecniche di PCR in tempo reale e di procedure di diagnostica *in vitro*.
- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Prima di utilizzare VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, leggere attentamente le istruzioni per l'uso del prodotto VIASURE e il Manuale utente di BD MAX™ System. Eseguire il test soltanto dopo aver compreso le informazioni sulle procedure, le precauzioni di sicurezza e le limitazioni ivi riportate.
- Non utilizzare reagenti e/o materiali scaduti.
- Non utilizzare il kit se l'etichetta che sigilla la scatola esterna è rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la scatola protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la confezione protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'interno della loro confezione il materiale essiccante non è presente o è rotto.
- Non rimuovere il materiale essiccante dalla confezione dei reagenti.
- Non utilizzare i reagenti se il sigillo metallico è rotto o danneggiato.
- Non mescolare reagenti di diverse confezioni e/o kit e/o lotti.
- Per proteggere la master mix dalla luce solare, dopo ogni utilizzo richiudere immediatamente la confezione protettiva dei reagenti con la chiusura a zip. Rimuovere l'aria in eccesso dalle confezioni prima di sigillarle.
- Proteggere i reagenti dall'umidità. L'esposizione prolungata all'umidità può influire sulle prestazioni del prodotto.
- Per evitare il deterioramento dell'etichetta, non utilizzare il prodotto vicino a solventi.
- Se la miscela di reazione in formato stabilizzato, normalmente presente in fondo alla provetta, ha un aspetto diverso da quello solito (senza forma conica, non omogenea, più piccola/più grande e/o di colore differente dal biancastro) non altera la funzionalità del test.
- Assicurarsi che la provetta di reazione e la provetta del tampone di reidratazione siano innestate saldamente in posizione durante l'allestimento della griglia BD MAX™.
- Nel caso in cui vengano eseguiti altri test di PCR nella stessa area del laboratorio, assicurarsi che il VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, il kit di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA-3, i reagenti aggiuntivi richiesti per il test e il BD MAX™ System non siano contaminati. Evitare sempre la contaminazione dei reagenti con microbi e ribonucleasi (RNasi)/desossiribonucleasi (DNasi). Si consiglia l'uso di puntali per pipette di trasferimento positivi o resistenti agli aerosol e privi di RNasi/DNasi. Usare un nuovo puntale per ogni campione. È necessario cambiarsi i guanti prima di manipolare reagenti e cartucce (BD MAX™ PCR Cartridge).

- Per evitare la contaminazione dell'ambiente da parte di amplicon, non disassemblare la BD MAX™ PCR Cartridge dopo l'uso. I sigilli della BD MAX™ PCR Cartridge sono progettati per prevenire la contaminazione.
- Progettare un flusso di lavoro unidirezionale. Deve iniziare nell'area di estrazione e poi spostarsi nell'area di amplificazione e rilevamento. Non riportare campioni, strumenti e reagenti nell'area in cui è stato eseguito il passaggio precedente.
- Rispettare le buone pratiche di laboratorio. Indossare indumenti protettivi e utilizzare guanti monouso, occhialini e mascherina. Non mangiare, bere, fumare o applicare prodotti cosmetici all'interno dell'area di lavoro. Lavarsi le mani al termine del test.
- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi e/o a rischio biologico, così come i reagenti e i materiali che sono stati esposti ai campioni e devono essere gestiti nel rispetto delle normative di sicurezza nazionali. Prendere le precauzioni necessarie durante la raccolta, il trasporto, la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento dei campioni.
- I campioni e i reagenti devono essere manipolati in una cappa di biosicurezza. Usare dispositivi di protezione individuale (DPI) compatibili con le linee guida correnti per la manipolazione dei campioni potenzialmente infettivi. Smaltire i rifiuti in conformità ai regolamenti locali e nazionali.
- Si raccomanda una decontaminazione degli strumenti utilizzati abitualmente, soprattutto le micropipette e le superfici di lavoro.
- In conformità al Regolamento (CE) n. 1907/2006 (REACH), i VIASURE Assays for BD MAX™ System non richiedono una scheda di dati sulla sicurezza dei materiali vista la classificazione come non pericolosi per la salute e per l'ambiente, poiché non contengono sostanze e/o miscele che soddisfano i criteri di classificazione dei rischi riportati nel Regolamento (CE) n. 1272/2008 (CLP) o presenti a concentrazioni superiori al valore definito nel regolamento sopra menzionato in base alla relativa dichiarazione. È possibile richiedere a Certest Biotec S.L. una dichiarazione in cui si afferma che non è richiesta la scheda sulla sicurezza dei materiali.
- Assicurarsi che la definizione del programma di test PCR sul BD MAX™ System sia eseguita attenendosi alle istruzioni riportate nella sezione "Protocollo PCR" (parametri di estrazione del campione, codici a barre personalizzati, impostazioni PCR, ecc.).
- Consultare il manuale utilizzatore del BD MAX™ System per maggiori informazioni su avvertenze, precauzioni e procedure.
- Il certificato di analisi non è incluso nel dispositivo. In caso di necessità, può essere scaricato dal sito web di Certest Biotec S.L. (www.certest.es).

8. Procedura di test

8.1. Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni

Il VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System è stato testato su campioni di tamponi di lesioni cutanee anogenitali e orali raccolti utilizzando Copan ESwab® (Copan Liquid Amies Elution Swab) (di seguito denominati campioni naturali di lesioni cutanee). Altri tipi di campioni devono essere convalidati dall'utilizzatore.

Il prelievo, la conservazione e il trasporto dei campioni devono rispettare le condizioni convalidate dall'utilizzatore. In generale, i campioni clinici devono essere raccolti ed etichettati in modo appropriato in contenitori puliti con o senza mezzo di trasporto (a seconda del tipo di campione). Dopo il prelievo, i campioni devono essere messi in un sacchetto per materiale a rischio biologico e devono essere trasportati e processati il prima possibile per garantire la qualità del test. I campioni devono essere trasportati a temperatura ambiente (TA) o a 2 ± 2 °C entro le prime 48 ore, nel rispetto delle normative locali e nazionali per il trasporto di materiale patogeno. Per i trasporti di lunga durata, si raccomanda una spedizione a -20 °C o a temperatura inferiore². I campioni inviati per il test molecolare devono essere conservati in condizioni controllate, in modo che gli acidi nucleici non si degradino durante la conservazione. Per il test è consigliato l'uso di campioni freschi, ma qualora ciò non fosse possibile o in caso di uno studio retrospettivo, i campioni devono essere conservati preferibilmente a -70 °C o -80 °C e, in alternativa, a -20 °C³.

I campioni clinici devono essere prelevati, trasportati e conservati secondo le linee guida di laboratorio e/o i manuali di gestione di laboratorio appropriati. Come esempio, consultare le linee guida 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) 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 Infecc. y Microbiol. Clin. (English ed.)* 37, 127–134 (2019).

Nota bene: le condizioni di raccolta, trasporto e conservazione dei campioni sopra indicate sono suggerite sulla base delle raccomandazioni per i campioni del tratto genitourinario destinati al rilevamento degli acidi nucleici riportate nelle guide di riferimento citate in precedenza. Tuttavia, per le corrette modalità di trasporto e conservazione dei campioni si raccomanda di rispettare le linee guida del laboratorio e/o il manuale di gestione del laboratorio di microbiologia.

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).

È stato condotto uno studio interno sulla stabilità dei campioni con VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System utilizzando una matrice naturale negativa di lesione cutanea addizionata con Herpesvirus umano 1, ceppo KOS (ATCC® VR-1493 Cod. FR-310 (IRR)), virus Herpes simplex Tipo 2, ceppo MS (Cod. 0810006CF, Zeptomatrix) e *Treponema pallidum*, ceppo SS14 (Washington University) a una concentrazione di 3xLoD. La stabilità è stata analizzata mediante tre test diversi: stabilità del campione primario nidificato con stabilità nella SBT a 2±2 °C e 25±2 °C, stabilità del campione primario a -20±2 °C e cicli di congelamento (-80 °C)-scongelo (25 °C). I risultati hanno mostrato buone prestazioni dei campioni conservati in tutte le condizioni di test. In conclusione, per quanto riguarda la stabilità del campione primario, i campioni naturali di lesioni cutanee sono stabili dopo 48 ore a 2±2 °C e 25±2 °C. Per quanto riguarda la stabilità nella SBT, i campioni sono stabili dopo 7 giorni nella SBT a 2±2 °C e 25±2 °C (dopo essere rimasti fino a 48 ore a 2±2 °C e 25±2 °C prima dell'aggiunta alla SBT). Inoltre, i campioni sono stabili dopo 6 mesi di conservazione a -20±2 °C e per almeno 5 cicli di congelamento/scongelo.

8.2. Preparazione del campione ed estrazione del DNA

Preparare il campione nel rispetto delle raccomandazioni presenti nelle istruzioni per l'uso del kit di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA-3.

1. Pipettare 500 µL di campione in una provetta di tampone campione del kit BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube e chiudere la provetta con un tappo perforabile. Effettuare una miscelazione completa utilizzando il vortex ad alta velocità per 1 minuto. Proseguire con l'azionamento del BD MAX™ System Operation.

Nota: assicurarsi che l'utilizzo del vortex avvenga pochi minuti prima dell'avvio del ciclo. Se si utilizza lo stesso BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube per ripetere il test, si raccomanda di agitare manualmente la provetta per alcuni minuti prima di avviare il test per garantire un'omogeneizzazione corretta del campione.

Le procedure di preparazione dell'estrazione per applicazioni specifiche devono essere sviluppate e convalidate dall'utilizzatore e altri tipi di campioni potrebbero richiedere un pretrattamento.

8.3. Protocollo PCR

Nota: consultare il manuale utilizzatore del BD MAX™ System per istruzioni dettagliate.

8.3.1. Creazione del programma di test PCR per VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System

Nota: se è già stato creato il test per il VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, è possibile saltare il passaggio 8.3.1 e andare direttamente all'8.3.2.

- 1) Nella schermata "Run" (Esegui) del BD MAX™ System, selezionare la scheda "Test Editor" (Modifica test).
- 2) Fare clic sul pulsante "Create" (Crea).

Nella scheda "Basic Information" (Informazioni di base):

- 3) Nel campo "Test Name" (Nome del test), inserire il nome del test, ossia, VIASURE HHT.
Nota: il nome del test deve essere univoco e non deve superare i venti caratteri.
- 4) Nel menu a tendina "Extraction Type" (Tipo di estrazione), selezionare "ExK TNA-3".
- 5) Nel menu a tendina "Master Mix Format" (Formato master mix), scegliere "Type 5: Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer" (Tipo 5: master mix liofilizzato concentrato con tampone di reidratazione).
- 6) Nel campo "Sample Extraction Parameters" (Parametri di estrazione del campione) selezionare "User Defined" (Definiti dall'utilizzatore) e regolare i valori dei parametri riportati di seguito (Tabella 4).

<i>Sample Extraction Parameters</i> (Parametri di estrazione del campione)	<i>Value (units)</i> (Valore (unità))
<i>Lysis Heat Time</i> (Tempo di lisi per calore)	15 (min)
<i>Lysis Temperature</i> (Temperatura di lisi)	55 (°C)
<i>Sample Tip Height</i> (Altezza della punta del campione)	1600 (steps)
<i>Sample Volume</i> (Volume del campione)	475 (µL)
<i>Wash Volume</i> (Volume di lavaggio)	500 (µL)
<i>Neutralization Volume</i> (Volume di neutralizzazione)	N/A
<i>DNase Heat Time</i> (Tempo di riscaldamento della DNasi)	N/A

Tabella 4. Parametri di estrazione del campione eseguita con BD MAX™ ExK™ TNA-3.

- 7) Nel campo "Ct Calculation" (Calcolo Ct) selezionare "Call Ct at Threshold Crossing" (Chiamare Ct al superamento del limite) (selezione predefinita).
- 8) Se si utilizza la versione 5.00 o superiore del software e si dispone di provette snap-in sigillate con codice a barre, nel campo "Custom Barcodes" (Codici a barre personalizzati) selezionare la seguente configurazione:
 - a. Snap-In 2 Barcode (Codice a barre Snap-In 2): 1E (relativo a *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* reaction tube).
 - b. Snap-In 3 Barcode (Codice a barre Snap-In 3): 11 (per Rehydration Buffer tube)

Nella scheda “PCR Settings” (Impostazioni PCR):

- 9) Nel campo “PCR Settings” (Impostazioni PCR) inserire i seguenti parametri descritti nella Tabella 5: “Alias” (fino a sette caratteri alfanumerici), “PCR Gain” (Guadagno PCR), “Threshold” (Soglia), “Ct Min” (Ct minimo) e “Ct Max” (Ct massimo).

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

Tabella 5. “PCR settings” (Impostazioni di PCR).

Nota: come punto di partenza, si consiglia di impostare i valori soglia minimi sopraelencati per ciascun canale; tuttavia, le impostazioni finali devono essere stabilite dall'utilizzatore finale durante l'interpretazione dei risultati in modo da assicurarsi che le soglie rientrino nella fase esponenziale delle curve di fluorescenza e che siano al di sopra di qualsiasi segnale di fondo. Il valore soglia per i diversi strumenti può variare a causa delle diverse intensità del segnale.

- 10) Nel campo “Color compensation” (Compensazione del colore) inserire i seguenti parametri (Tabella 6).

		False Receiving Channel (Canale di ricezione falso)					
		Channel (Canale)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canale di eccitamento)	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	-	

Tabella 6. Parametri “Color compensation” (Compensazione del colore).

Nella scheda “Melt Settings” (Impostazioni di melting) non è necessaria alcuna azione poiché il parametro non si applica a questo prodotto.

Nella scheda “Test Steps” (Fasi del test):

- 11) Inserire il nome della fase (fino a venti caratteri) e impostare i seguenti parametri per definire ciascuna fase del protocollo PCR: “Profile Type” (Tipo di profilo), “Cycles” (Cicli), “Time” (Tempo) e “Temperature” (Temperatura), quindi selezionare il campo “Detect” (Rileva) per definire la fase di rilevamento (Tabella 7). Fare clic sul pulsante “Add” (Aggiungi) per aggiungere una nuova fase e ripetere l'operazione fino a definire tutte le fasi necessarie.

Nota: il campo “Type” (Tipo) deve essere vuoto.

<i>Step</i> (Fase)	<i>Step name</i> (Nome fase)	<i>Profile Type</i> (Tipo profilo)	<i>Cycles</i> (Cicli)	<i>Time (s)</i> (Tempo (s))	<i>Temperature</i> (Temperatura)	<i>Detect</i> (Rileva)
Initial denaturation (Denaturazione iniziale)	IN-denaturation	<i>Hold</i>	1	120	98 °C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturazione e Appaiamento /Estensione (Raccolta dati))	Annealing/Extension	<i>2-Temperature</i>	45	10	95 °C	-
				41	63 °C	✓

Tabella 7. Protocollo PCR.

Nella scheda “Result Logic” (Logica del risultato):

- 12) Nel campo “Target” assegnare un nome al target, ovvero HSV1 (utilizzando non più di sette caratteri alfanumerici). Ripetere i passaggi 12-15 per ogni target (ovvero HSV2 o TRE) seguendo le tabelle specifiche per il target da definire.
- 13) Fare clic sulla casella di controllo “Analyze” (Analizza) per includere le lunghezze d’onda desiderate (canali PCR) nell’analisi del risultato del target (Tabelle 8-10).

<i>Wavelength</i> (Lunghezza d’onda)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Tipo)	<i>Analyze</i> (Analizza)
475/520	HSV1	PCR	✓
585/630	EIC	PCR	✓

Tabella 8. Selezione dei canali PCR nella scheda “Result logic” (Logica del risultato) per il target HSV1 (virus Herpes simplex 1).

<i>Wavelength</i> (Lunghezza d’onda)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Tipo)	<i>Analyze</i> (Analizza)
530/565	HSV2	PCR	✓
585/630	EIC	PCR	✓

Tabella 9. Selezione dei canali PCR nella scheda “Result logic” (Logica del risultato) per il target HSV2 (virus Herpes simplex 2).

<i>Wavelength</i> (Lunghezza d’onda)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Tipo)	<i>Analyze</i> (Analizza)
585/630	EIC	PCR	✓
630/665	TRE	PCR	✓

Tabella 10. Selezione dei canali PCR nella scheda “Result logic” (Logica del risultato) per il target TRE (*Treponema pallidum*).

- 14) Fare clic sul pulsante “Edit Logic” (Modifica logica).
- 15) Nella finestra “Edit Logic” (Modifica logica) vengono elencate tutte le combinazioni di tipi di risultato. Per ogni riga, nel menu a tendina “Result” (Risultato) selezionare il risultato che viene richiamato quando si verificano le condizioni di quella riga, seguendo le Tabelle 11-13.

<i>Result</i> (Risultato)	<i>HSV1</i> (475/520)	<i>EIC</i> (585/630)
POS	Valid (Valido)	Valid (Valido)
UNR	Valid (Valido)	Invalid (Non valido)
NEG	Invalid (Non valido)	Valid (Valido)
UNR	Invalid (Non valido)	Invalid (Non valido)

Tabella 11. Elenco della combinazione di tipi di risultato e di logica del risultato per il target HSV1 (virus Herpes simplex 1). I risultati disponibili sono POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Non risolto).

<i>Result</i> (Risultato)	HSV2 (530/565)	EIC (585/630)
POS	Valid (Valido)	Valid (Valido)
UNR	Valid (Valido)	Invalid (Non valido)
NEG	Invalid (Non valido)	Valid (Valido)
UNR	Invalid (Non valido)	Invalid (Non valido)

Tabella 12. Elenco della combinazione di tipi di risultato e di logica del risultato per il target HSV2 (virus Herpes Simplex 2). I risultati disponibili sono POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Non risolto).

<i>Result</i> (Risultato)	TRE (630/665)	EIC (585/630)
POS	Valid (Valido)	Valid (Valido)
UNR	Valid (Valido)	Invalid (Non valido)
NEG	Invalid (Non valido)	Valid (Valido)
UNR	Invalid (Non valido)	Invalid (Non valido)

Tabella 13. Elenco della combinazione di tipi di risultato e di logica del risultato per il target TRE (*Treponema pallidum*). I risultati disponibili sono POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Non risolto).

Nota: in base al Ct Max precedentemente definito (Tabella 5), il tipo di risultato per i canali HSV1 (475/520), HSV2 (530/565), EIC (585/630) e TRE (630/665) è considerato "Valid" (Valido) quando il valore di Ct ottenuto è ≤ 40 e "Invalid" (Non valido) quando il valore di Ct ottenuto è > 40 .

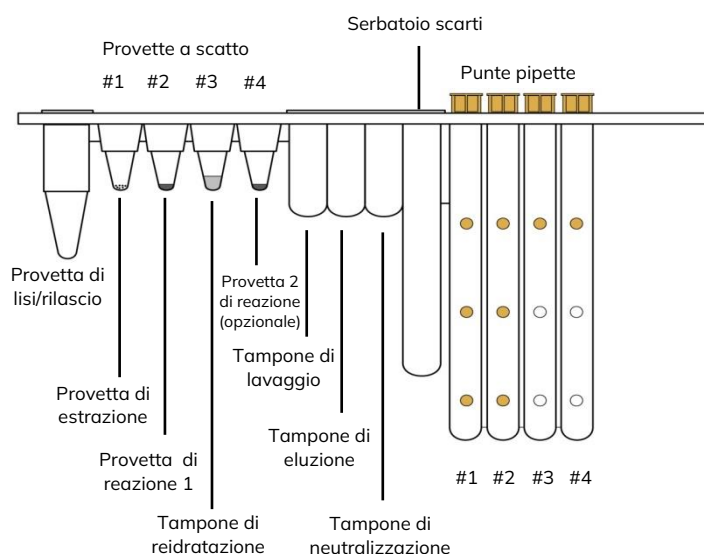
16) Fare clic sul pulsante "Save" (Salva) per salvare il test.

8.3.2. Preparazione della griglia BD MAX™

- 1) Per ogni campione da testare, rimuovere una Unitized Reagent Strip dal BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Picchiare delicatamente ogni striscia su una superficie dura per assicurarsi che tutti i liquidi si trovino sul fondo delle provette, quindi posizionarle sulla griglia del BD MAX™ System.
- 2) Rimuovere il numero richiesto di provette di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (sigillo bianco) dalla loro confezione protettiva. Posizionare l'/gli Extraction Tube(s) (sigillo bianco) nelle posizioni corrispondenti sulla striscia di TNA (posizione 1, codifica di colore bianco sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
- 3) Determinare e separare il numero appropriato di *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* reaction tubes (sigillo 1E) e posizionarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 2, codifica di colore verde sulla griglia. Vedere Figura 1).
 - a. Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione in alluminio con la cerniera.
 - b. Per effettuare una corretta reidratazione, assicurarsi che il prodotto liofilizzato si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica. Picchiare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il prodotto si trovi in fondo alla provetta.

- 4) Rimuovere il numero richiesto di Rehydration Buffer tubes (sigillo 11) e posizzionarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 3, nessuna codifica di colore sulla griglia. Vedere Figura 1).
 - a. Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
 - b. Per effettuare un trasferimento corretto, assicurarsi che il liquido si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica. Picchiettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il tampone si trovi in fondo alla provetta.

Figura 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) dal BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit



8.3.3. Configurazione dello strumento BD MAX™

- 1) Selezionare la scheda "Worklist" (Elenco di lavoro) sulla schermata "Run" (Esegui) del software BD MAX™ System nella versione v4.50A o superiore.
- 2) Nel menu a tendina "Test" selezionare il test desiderato, ossia VIASURE HHT (se non è ancora stato creato, vedere la sezione 8.3.1).
- 3) Nel menu a tendina "Kit Lot Number" (Numero di lotto del kit), selezionare il numero di lotto appropriato per il kit (riportato sulla scatola esterna del kit di estrazione utilizzato) (opzionale).
Nota: i numeri di lotto devono essere definiti nella schermata "Inventory" (Inventario) prima di poterli selezionare in questo punto.
- 4) Inserire il numero identificativo della Sample Buffer Tube nel campo "Sample tube" (Provetta del campione), mediante scansione del codice a barre con lo scanner oppure manualmente.
- 5) Compilare il campo "Patient ID" (ID paziente) e/o "Accession" (Accesso) e fare clic sul tasto "Tab" (Tabulazione) o su Enter (Invio). Continuare fino all'inserimento dei codici a barre di tutte le Sample Buffer Tube. Assicurarsi che l'ID campione/paziente e le Sample Buffer Tube siano abbinati correttamente.

- 6) Posizionare la Sample Buffer Tube preparata sulla(e) griglia(e) BD MAX™.
- 7) Caricare le griglie sul BD MAX™ System (la griglia A si trova sul lato sinistro del BD MAX™ System, la griglia B sul lato destro).
- 8) Posizionare il numero richiesto di BD MAX™ PCR Cartridge nel BD MAX™ System.
- 9) Chiudere la porta del BD MAX™ System.
- 10) Fare clic su “Start” (Inizia) per iniziare la procedura.

8.3.4. Report dei risultati di BD MAX™

- 1) Nella barra dei menu, fare clic sul pulsante “Results” (Risultati).
- 2) Fare clic due volte sul test in esecuzione incluso nell’elenco oppure premere il pulsante “View” (Visualizza).
- 3) I pulsanti “Print” (Stampa) ed “Export” (Esporta) nella parte inferiore della schermata risulteranno attivi.

Per stampare i risultati:

1. Fare clic sul pulsante “Print” (Stampa).
2. Nella finestra di anteprima di stampa del rapporto di esecuzione, selezionare: “Run Details” (Dettagli esecuzione), “Test Details” (Dettagli test) e “Plots” (Grafici).
3. Fare clic su “Print” (Stampa) per stampare il rapporto o su “Export” (Esporta) per esportare un PDF del rapporto su una chiavetta USB.

Per esportare i risultati:

1. Fare clic sul pulsante “Export” (Esporta) per trasferire il rapporto (file PDF e CSV) su una chiavetta USB.
2. Al termine dell’esportazione, nella finestra “Results Export” (Esportazione dei risultati) viene visualizzata l’icona di successo o di errore.

9. Interpretazione dei risultati

Per una descrizione dettagliata su come analizzare i dati, fare riferimento al manuale utente del BD MAX™ System.

L’analisi dei dati viene svolta dal software del BD MAX™ System, sulla base delle istruzioni del produttore. Il software del BD MAX™ System riporta i valori di Ct e le curve di amplificazione per tutti i canali di rilevazione di ciascun campione testato nel seguente modo:

- Valore di Ct pari a 0: indica che il software non ha calcolato nessun valore di Ct nei limiti specificati (vedere Tabella 5). La curva di amplificazione del campione che presenta un valore di Ct pari a “0” deve essere controllata manualmente.

- Un valore di Ct pari a -1 indica che non è avvenuto alcun processo di amplificazione, che non è stato calcolato alcun valore di Ct dal software oppure che il valore di Ct calcolato è inferiore alla soglia specificata o superiore al Ct Max stabilito (Cut-off).
- Qualunque altro valore di Ct deve essere interpretato in correlazione con la curva di amplificazione e secondo la logica del risultato prestabilita, nel rispetto delle linee guida di interpretazione riportate nella Tabella 14.

Controllare il segnale del controllo interno endogeno (EIC) per verificare il corretto funzionamento della miscela di amplificazione. Inoltre, verificare che non sia presente nessun report di errore del BD MAX™ System.

I risultati devono essere letti e analizzati utilizzando la seguente tabella:

HSV-1 (nome del target: HSV1)	HSV-2 (nome del target: HSV2)	<i>T. pallidum</i> (nome del target: TRE)	Interpretazione di singoli campioni del paziente
POS	POS	POS	DNA di HSV-1, HSV-2 e <i>Treponema pallidum</i> rilevato.
POS	POS	NEG	DNA di HSV-1 e HSV-2 rilevato. DNA di <i>Treponema pallidum</i> non rilevato.
POS	NEG	POS	DNA di HSV-1 e <i>Treponema pallidum</i> rilevato. DNA di HSV-2 non rilevato.
NEG	POS	POS	DNA di HSV-2 e <i>Treponema pallidum</i> rilevato. DNA di HSV-1 non rilevato.
POS	NEG	NEG	DNA di HSV-1 rilevato. DNA di HSV-2 e <i>Treponema pallidum</i> non rilevato.
NEG	POS	NEG	DNA di HSV-2 rilevato. DNA di HSV-1 e <i>Treponema pallidum</i> non rilevato.
NEG	NEG	POS	DNA di <i>Treponema pallidum</i> rilevato. DNA di HSV-1 e HSV-2 non rilevato.
NEG	NEG	NEG	DNA di HSV-1, HSV-2 e <i>Treponema pallidum</i> non rilevato.
UNR	UNR	UNR	Risultato non risolto (UNR) dovuto alla presenza di inibitori nella reazione PCR o a un problema generale (non segnalato da un codice di errore) durante le fasi di elaborazione del campione e/o di amplificazione. ¹
IND	IND	IND	Risultato test indeterminato (IND). Dovuto a guasto nel BD MAX™ System. Questo risultato del test viene visualizzato in caso di guasto dello strumento associato ad un codice di errore. ²
INC	INC	INC	Risultato test incompleto (INC). Dovuto a guasto nel BD MAX™ System. Visualizzazione del risultato del test in caso di mancato completamento del test. ²

Tabella 14. Interpretazione del campione.

¹ Il controllo interno endogeno (EIC) deve mostrare un segnale di amplificazione con un valore di Ct ≤40 per essere preso in considerazione. In assenza del segnale dell'EIC o in presenza di un valore di Ct >40, il risultato viene considerato Non risolto (UNR) ed è necessario ripetere il test. Si raccomanda di ripetere il test dalla stessa provetta Sample Buffer Tube (SBT), dallo stesso campione preparando una nuova SBT o da un nuovo campione (più concentrato, se possibile). Può anche accadere che il risultato Non risolto (UNR) sia dovuto alla presenza di inibitori nella reazione PCR. In questi casi, si raccomanda di diluire i campioni 1/10.

NOTA: i campioni naturali di lesioni cutanee possono essere conservati senza trasferimento nella SBT per un massimo di 48 ore se conservati a $2\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $25\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (espressi in ESwab® di Copan). In caso di ripetizione del test dalla stessa SBT, si raccomanda di agitare manualmente la SBT per garantire un'omogeneizzazione corretta del campione. I campioni naturali di lesioni cutanee possono essere conservati nella SBT fino a 7 giorni a $2\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $25\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2 È possibile ottenere risultati indeterminati (IND) o incompleti (INC) a causa di un errore di sistema; in tal caso, è necessario ripetere il test. Per l'interpretazione dei codici di avvertenza ed errore, fare riferimento al manuale utilizzatore del BD MAX™ System.

Nota: l'utilizzo di controlli esterni deve fornire i seguenti risultati attesi: negativo per l'ENC e positivo per l'EPC (si prevede che i campioni positivi noti siano positivi solo per i microrganismi presenti nel campione). Un ENC che fornisce un risultato di test positivo indica un evento di contaminazione o un errore nella manipolazione del campione. Un EPC che fornisce un risultato negativo indica un problema nella manipolazione/preparazione del campione. Rivedere la tecnica di manipolazione/preparazione del campione. In caso di errore del controllo esterno, è necessario ripetere il test.

In caso di un risultato ambiguo continuo, si raccomanda di rileggere le istruzioni per l'uso e la procedura di estrazione usata dall'utilizzatore, di verificare la corretta esecuzione di ciascun passaggio del test PCR e di rivedere i parametri. Infine, si raccomanda di verificare la forma sigmoide della curva e l'intensità della fluorescenza.

I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.

10. Limiti del test

- I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.
- Sebbene questo test possa essere utilizzato con altri tipi di campioni, è stato validato solo con campioni di tamponi di lesioni cutanee anogenitali e orali.
- Per prestazioni del test ottimali, il prodotto liofilizzato deve trovarsi in fondo alla provetta e non deve aderire alla parte superiore della provetta o del sigillo di alluminio. Picchiettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il prodotto si trovi in fondo alla provetta.
- Poiché è possibile che, in assenza di target da rilevare, nei canali vuoti di BD MAX™ System possa verificarsi *crosstalk*, durante l'interpretazione dei risultati è necessario selezionare solo i canali in cui sono presenti target da amplificare. Per eventuali chiarimenti, contattare viasuresupport@certest.es
- La qualità del test è subordinata alla qualità del campione; l'estrazione dell'acido nucleico dai campioni clinici deve essere effettuata in modo corretto.
- Questo test è un test qualitativo, non fornisce pertanto valori quantitativi né indica il numero di microrganismi presenti. Non è possibile mettere in correlazione i valori Ct ottenuti dalla PCR con la concentrazione del campione, perché essi dipendono dal termociclatore utilizzato e dall'esecuzione in sé.

- Benché possano essere rilevati livelli estremamente bassi, al di sotto del limite di rilevamento, i risultati potrebbero non essere riproducibili.
- È necessario prestare attenzione all'intervallo di misurazione previsto dal test perché i campioni con concentrazioni superiori o inferiori a tale range possono fornire risultati errati.
- Esiste la possibilità di falsi positivi a causa della contaminazione crociata con campioni di HSV-1, HSV-2 e/o *T. pallidum* contenenti concentrazioni elevate di DNA target oppure per la contaminazione dovuta ai prodotti della PCR di reazioni precedenti.
- Le combinazioni specifiche di primer e sonda per il rilevamento del gene della *glicoproteina L UL1* dell'HSV-1, del gene della *glicoproteina G US4* dell'HSV-2 e del gene *16S rRNA* del *T. pallidum*, utilizzate in *VIASURE HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum Assay for BD MAX™ System*, non mostrano significative omologie combinate con il genoma umano, con la microflora umana o altri microorganismi, che potrebbero portare ad un falso positivo prevedibile.
- Risultati falsi negativi possono dipendere da numerosi fattori, anche in combinazione tra loro, tra cui:
 - Metodi non corretti di prelievo, trasporto, conservazione e/o manipolazione dei campioni.
 - Procedure di elaborazione errate (inclusa l'estrazione di DNA).
 - Deterioramento del DNA durante l'invio/la conservazione e/o l'elaborazione dei campioni.
 - Mutazioni o polimorfismi nei siti di legame del primer o della sonda possono influenzare il rilevamento di ceppi nuovi o non noti di HSV-1, HSV-2 e/o *T. pallidum*.
 - Carica microbica del campione al di sotto del limite di rilevamento del test.
 - Presenza di inibitori della qPCR o di altri tipi di sostanze interferenti. Non è stato valutato l'impatto di vaccini, alcune terapie antivirali, antibiotiche, chemioterapiche, farmaci immunosoppressori o antimicotici utilizzati per prevenire l'infezione o durante il trattamento della stessa.
 - L'effetto delle sostanze interferenti è stato valutato solo per quelle riportate nella sezione 12.5.1 (Studio sulle sostanze interferenti) delle presenti istruzioni per l'uso. Consultare tale sezione per controllare le sostanze endogene ed esogene più comuni capaci di indurre un'interferenza totale o parziale sulla reazione qPCR. Anche altre sostanze, non indicate, potrebbero indurre risultati errati.
 - Mancata aderenza alle istruzioni per l'uso e alla procedura di test.
- Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di microrganismi vitali e non implica che questi microrganismi siano infettivi o siano gli agenti eziologici dei sintomi clinici. Tuttavia, un risultato positivo indica la presenza delle sequenze target di HSV-1, HSV-2 e/o *T. pallidum*.
- Risultati negativi non precludono la presenza in un campione clinico del DNA di HSV-1, HSV-2 e/o *T. pallidum* e non devono essere utilizzati come unica indicazione per il trattamento o per altre decisioni sulla gestione del paziente. Non sono stati definiti tipi di campioni e timing ottimali per il picco dei livelli microbici in caso di infezioni da HSV-1, HSV-2 e/o *T. pallidum*. Per rilevare il patogeno può essere necessario prelevare più campioni (tipi e punti temporali di campionamento) dallo stesso paziente.

- Se i test diagnostici per altre malattie sessualmente trasmissibili (MST) sono negativi e le osservazioni cliniche, l'anamnesi del paziente e le informazioni epidemiologiche indicano la possibilità di un'infezione da HSV-1, HSV-2 e/o *T. pallidum*, è necessario prendere in considerazione un risultato falso negativo e valutare la ripetizione del test.
- I valori di fluorescenza possono variare a causa di molteplici fattori, tra cui: apparecchiatura PCR (anche se dello stesso modello), sistema di estrazione, tipo di campione, precedente trattamento del campione, ecc.
- I valori predittivi positivi e negativi dipendono in larga misura dalla prevalenza in tutti i test diagnostici *in vitro*. Le prestazioni di VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System possono variare in base alla prevalenza e alla popolazione testata.
- È richiesto un nuovo test nel caso in cui si ottengano risultati non risolti, indeterminati o incompleti utilizzando il VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. I risultati non risolti possono essere dovuti alla presenza di inibitori nel campione o a una reidratazione non corretta della provetta di miscelazione di reazione liofilizzata. Un danno agli strumenti può comportare risultati indeterminati o incompleti.

11. Controllo di qualità

Il VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System contiene un controllo interno endogeno (EIC) in ogni provetta di reazione, che conferma il funzionamento corretto della tecnica. Inoltre, l'uso di controlli esterni (EPC ed ENC) consente di confermare le prestazioni del test. I controlli esterni non vengono utilizzati dal BD MAX™ System ai fini dell'interpretazione dei risultati, ma vengono considerati come un campione. Il controllo positivo esterno (EPC) è concepito per monitorare un eventuale mancato funzionamento dei reagenti del test, mentre il controllo negativo esterno (ENC) serve a rilevare la contaminazione ambientale o dei reagenti da parte di acidi nucleici target.

12. Caratteristiche di prestazione analitica

12.1. Linearità analitica

La linearità del test è stata determinata e confermata analizzando una serie di diluizioni 1:10 di una matrice artificiale di lesione cutanea⁴ (Artificial Matrix for Cutaneous Lesion, Biochemazone BZ394) contenente una concentrazione nota (compresa tra 2E+07 e 2E+01 copie/μL) di DNA specifico e sintetico appartenente a HSV-1, HSV-2 e *T. pallidum*. Di seguito è riportato un grafico di amplificazione esemplificativo di un test:

⁴ A causa della scarsa disponibilità di campioni di tamponi di lesioni cutanee anogenitali e orali, è stato condotto uno studio di equivalenza tra matrice naturale e matrice artificiale per confermare che la matrice artificiale potesse essere utilizzata nei test di convalida. Pertanto, la matrice naturale e la matrice artificiale sono state testate e confermate come equivalenti.

Figura 2. Serie di diluizioni del template di HSV-1 (da $2E+07$ a $2E+01$ copie/ μ L) analizzate sul BD MAX™ System (canale 475/520 (FAM)).

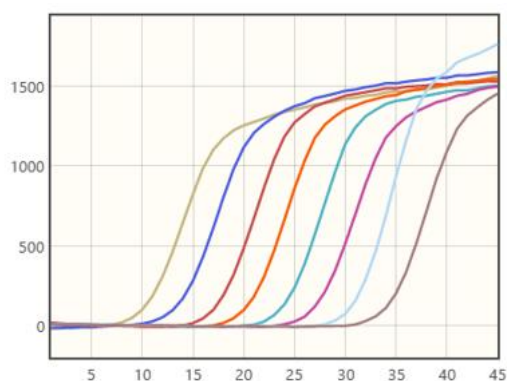


Figura 3. Serie di diluizioni del template di HSV-2 (da $2E+07$ a $2E+01$ copie/ μ L) analizzate sul BD MAX™ System (canale 530/565 (HEX)).

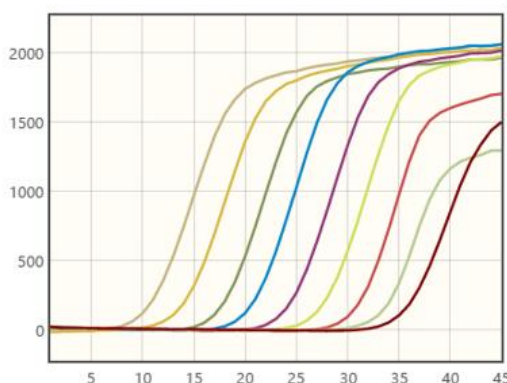
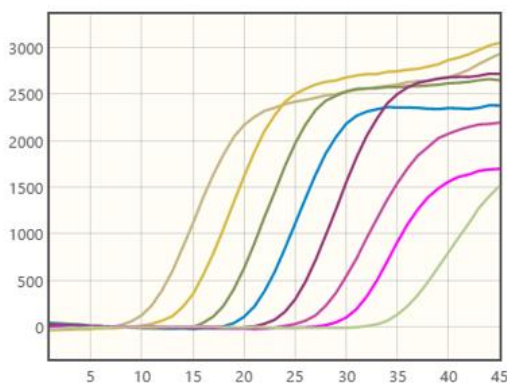


Figura 4. Serie di diluizioni del template di *T. pallidum* (da $2E+07$ a $2E+01$ copie/ μ L) analizzate sul BD MAX™ System (canale 630/665 (Cy5)).



12.2. Sensibilità analitica

La sensibilità analitica viene spesso indicata come limite di rilevabilità (LoD). In pratica, i parametri LoD e LoB (Limite del bianco) vengono determinati all'interno della valutazione della sensibilità analitica.

12.2.1. Limite del bianco (LoB)

Per determinare il "Limite del bianco" (LoB), è stato eseguito un test di controllo senza template utilizzando tre lotti di VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System e 24 repliche di tre tipi di campioni: campioni naturali negativi di lesioni cutanee, matrice artificiale di lesione cutanea e acqua priva di RNasi/DNasi.

È stata verificata l'assenza di segnale nei canali FAM, HEX e Cy5, nonché la presenza di segnale per il controllo interno endogeno (EIC) nel canale ROX in caso di matrice negativa (matrice di lesione cutanea naturale o simulata). In conclusione, i risultati ottenuti hanno confermato che il prodotto non genera amplificazioni aspecifiche nelle diverse matrici testate.

12.2.2. Limite di rivelabilità (LoD)

Il limite di rilevabilità (LoD) di VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System è stato analizzato con tre lotti utilizzando campioni naturali di lesioni cutanee. Sono stati utilizzati i seguenti ceppi di riferimento: Herpesvirus umano 1, ceppo KOS (ATCC® VR-1493, Cod. FR-310 (IRR)), virus Herpes simplex Tipo 2, ceppo MS (Cod. 0810006CF (Zeptomatrix)) e *Treponema pallidum*, ceppo SS14 (Washington University). In conclusione, VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System ha mostrato un LoD di 2,52E+02 TCID50/mL per HSV-1, 6,30E+00 TCID50/mL per HSV-2 e 6,60E+03 cellule/mL per *T. pallidum*, con un tasso di positività ≥95%, nei campioni naturali di lesioni cutanee.

12.3. Intervallo di misurazione

L'intervallo di misurazione del test è stato determinato testando una serie di diluizioni 1:10 a concentrazione nota di DNA specifico appartenente a HSV-1, HSV-2 e *T. pallidum*. I risultati hanno permesso di confermare il rilevamento corretto del target da 2E+07 a 2E+00 copie/μL per i target HSV-1 e *T. pallidum* e da 2E+07 a 2E-01 copie/μL per il target HSV-2.

In conclusione, l'intervallo di misurazione di VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System è stato determinato con successo, garantendo risultati affidabili, accurati e riproducibili su un ampio spettro di carichi virali/batterici, confermandone l'utilità in vari scenari di diagnosi clinica.

12.4. Accuratezza

12.4.1. Esattezza

L'esattezza di VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System è stata valutata testando il materiale di riferimento elencato di seguito addizionato a una matrice di lesione cutanea.

1. Frammenti di DNA sintetico

- Frammento di DNA sintetico per il gene della *glicoproteina L UL1* dell'HSV-1: HSV1.XPC, canale FAM.
- Frammento di DNA sintetico per il gene della *glicoproteina G US4* dell'HSV-2: HSV2.XPC, canale HEX.
- Frammento di DNA sintetico per il gene *16S rRNA* di *T. pallidum*: TREXPC, canale Cy5.

Tutti i frammenti di DNA sintetico sono stati rilevati correttamente nel canale appropriato.

2. American Type Culture Collection (ATCC®)

Codice prodotto esterno	Microorganismo	Nome del prodotto	Varietà	Risultato
VR-1493	Virus Herpes simplex 1	Human herpesvirus 1	Ceppo KOS	Rilevato
VR-260	Virus Herpes simplex 1	Human Herpesvirus 1	Ceppo HF	Rilevato
VR-539	Virus Herpes simplex 1	Human Herpesvirus 1	Ceppo MacIntyre	Rilevato
VR-733	Virus Herpes simplex 1	Human Herpesvirus 1	Ceppo F	Rilevato
VR-3393	Virus Herpes simplex 2	Human Herpesvirus 2	Ceppo G	Rilevato
VR-1779	Virus Herpes simplex 2	Human Herpesvirus 2	Ceppo ATCC-2011-2	Rilevato
BAA-2642SD	<i>Treponema pallidum</i>	Quantitative Synthetic <i>Treponema pallidum</i> DNA	N/A	Non rilevato

Tabella 15. Materiale di riferimento della American Type Culture Collection (ATCC®).

Tutti i ceppi della ATCC sono stati rilevati correttamente nel canale appropriato e l'EIC ha mostrato un'amplificazione con un valore di $Ct \leq 40$, a eccezione del Quantitative Synthetic *Treponema pallidum* DNA (codice ATCC BAA-2642SD). Questo DNA sintetico include frammenti dei geni *polA*, *23S*, *16S*, *flaA*, *proteina 47kDa* e *bmp*; tuttavia, l'assenza di rilevamento a concentrazioni molto elevate (fino a $4,70E+04$ copie/ μ L) utilizzando VIASURE Assay suggerisce che la regione target all'interno del gene *16S* non sia inclusa nel DNA sintetico di ATCC. Pertanto, non può essere utilizzato come materiale di riferimento.

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

Codice prodotto esterno	Microorganismo	Nome del prodotto	Varietà	Risultato
16/368	Virus Herpes simplex 1	1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-1 (HSV-1)	N/A	Rilevato
17/122	Virus Herpes simplex 2	1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-2 (HSV-2)	N/A	Rilevato

Tabella 16. Materiale di riferimento del National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC).

Tutti i ceppi del NIBSC sono stati rilevati correttamente nel canale appropriato e l'EIC ha mostrato un'amplificazione con un valore di $Ct \leq 40$.

4. Materiale di controllo

Codice prodotto esterno	Provenienza	Microorganismo	Nome del prodotto	Varietà	Risultato
0810006CF	ZeptoMetrix	Virus Herpes simplex 2	Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2)	Ceppo MS	Rilevato
MBC109	Vircell S.L.	<i>Treponema pallidum</i>	AMPLIRUN® TREPONEMA PALLIDUM DNA CONTROL	N/A	Rilevato
N/A	University of Washington	<i>Treponema pallidum</i>	Heat-killed <i>Treponema pallidum</i>	Ceppo Nichols	Rilevato
N/A	University of Washington	<i>Treponema pallidum</i>	Heat-killed <i>Treponema pallidum</i>	Ceppo SS14	Rilevato

Tabella 17. Materiale di controllo per HSV-2 e *T. pallidum* di Vircell S.L., ZeptoMetrix e University of Washington.

Tutti i ceppi e il materiale di riferimento utilizzati sono stati correttamente rilevati nel canale appropriato e l'EIC ha mostrato un'amplificazione con un valore di $Ct \leq 40$.

12.4.2. Precisione

Per determinare la precisione di VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, sono stati eseguiti test intra-saggio (ripetibilità), inter-saggio, inter-lotto e inter-termociclature (riproducibilità) con matrice artificiale di lesione cutanea addizionata con i ceppi di riferimento Human herpesvirus 1, ceppo KOS (ATCC® VR-1493, Cod. FR-310 (IRR)), virus Herpes simplex Tipo 2, ceppo MS (Cod. 0810006CF (Zeptomatrix)) e *Treponema pallidum*, ceppo SS14 (Washington University).

Intra-saggio

L'intra-saggio è stato effettuato analizzando sei repliche di tutti i campioni nello stesso ciclo con VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Una sintesi dei risultati è riportata nella tabella seguente.

Target	Canale	Tipo di campione	Ct (\bar{x})	σ	CV%
HSV-1	475/520 (FAM)	3xLoD	33,32	0,49	1,48
		5xLoD	32,93	0,12	0,37
		Controllo 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
		Controllo negativo	NEG	N/A	N/A
EIC	585/630 (ROX)	3xLoD	30,42	0,15	0,48
		5xLoD	29,90	0,48	1,60
		Controllo negativo	NEG	N/A	N/A
<i>Treponema pallidum</i>	630/665 (Cy5)	3xLoD	34,17	0,55	1,61
		5xLoD	31,95	0,43	1,35
		Controllo negativo	NEG	N/A	N/A

Tabella 18. Risultati intra-saggio di VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = ciclo-soglia, (\bar{x}) = valore medio aritmetico del Ct, (σ) = deviazione standard, (CV %) = coefficiente di variazione, NEG = negativo, N/A = non applicabile.

Inter-saggio

L'inter-saggio è stato effettuato analizzando quattro repliche dei diversi campioni, in tre giorni diversi, da tre diversi operatori che hanno utilizzato VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Una sintesi dei risultati è riportata nella tabella seguente.

Target	Canale	Tipo di campione	Ct (\bar{x})	σ	CV%
HSV-1	475/520 (FAM)	3xLoD	33,21	0,47	1,41
		5xLoD	31,85	0,78	2,43
		Controllo 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
		Controllo negativo	NEG	N/A	N/A
EIC	585/630 (ROX)	3xLoD	29,82	0,43	1,43
		5xLoD	29,94	0,40	1,33
		Controllo 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
		Controllo negativo	NEG	N/A	N/A

Tabella 19. Risultati inter-saggio di VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = ciclo-soglia. (\bar{x}) = valore medio aritmetico del Ct, (σ) = deviazione standard, (CV %) = coefficiente di variazione, NEG = negativo, N/A = non applicabile.

Inter-lotto

I valori inter-lotto sono stati determinati con sei repliche dei diversi campioni utilizzando tre lotti di VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Una sintesi dei risultati è riportata nella tabella seguente.

Target	Canale	Tipo di campione	Ct (\bar{x})	σ	CV%
HSV-1	475/520 (FAM)	3xLoD	33,26	0,46	1,38
		5xLoD	33,29	0,33	1,00
		Controllo 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
		Controllo negativo	NEG	N/A	N/A
EIC	585/630 (ROX)	3xLoD	30,04	0,57	1,89
		5xLoD	30,26	0,56	1,86
		Controllo 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
		Controllo negativo	NEG	N/A	N/A

Tabella 20. Risultati inter-lotto di VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = ciclo-soglia. (\bar{x}) = valore medio aritmetico del Ct, (σ) = deviazione standard, (CV %) = coefficiente di variazione, NEG = negativo, N/A = non applicabile.

Inter-termociclatore

I valori inter-termociclatore sono stati determinati con quattro repliche degli stessi campioni utilizzati per le determinazioni intra-saggio, inter-saggio e inter-lotto, utilizzando VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System con tre sistemi BD MAX™ diversi. Una sintesi dei risultati è riportata nella tabella seguente.

Target	Canale	Tipo di campione	Ct (\bar{x})	σ	CV%
HSV-1	475/520 (FAM)	3xLoD	33,71	0,52	1,54
		5xLoD	32,68	0,59	1,79
		Controllo 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
		Controllo negativo	NEG	N/A	N/A
EIC	585/630 (ROX)	3xLoD	29,51	0,77	2,59
		5xLoD	29,23	0,39	1,33
		Controllo 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
		Controllo negativo	NEG	N/A	N/A

Tabella 21. Risultati inter-termociclatore di VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = ciclo-soglia. (\bar{x}) = valore medio aritmetico del Ct, (σ) = deviazione standard, (CV %) = coefficiente di variazione, NEG = negativo, N/A = non applicabile.

In conclusione, lo studio sulla precisione ha confermato l'affidabilità delle prestazioni e la coerenza di VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

12.4.3. Accuratezza

L'esperimento sull'accuratezza è stato condotto attraverso l'analisi di pannelli provenienti da Programmi di Valutazione Esterna della Qualità (EQA). Sono stati analizzati campioni contenenti HSV-1, HSV-2 o *T. pallidum*, tra altri microrganismi non target. Tutti i risultati dei test, riportati nella tabella seguente, sono stati confrontati con i rapporti finali forniti dagli organizzatori dei programmi EQA.

Target	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)

Tabella 22. Risultati sull'accuratezza utilizzando VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (ORA) = accordo complessivo, (TP) = valore positivo reale, (TN) = valore negativo reale, (FP) = falso positivo, (FN) = falso negativo, (PPA) = percentuale di concordanza positiva, (NPA) = percentuale di concordanza negativa.

In conclusione, VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System fornisce un'elevata accuratezza nel rilevamento del DNA di HSV-1, HSV-2 e *T. pallidum*, con eccellenti valori NPA e PPA per tutti i ceppi testati.

12.5. Specificità analitica e reattività analitica

La specificità analitica e la reattività analitica di VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System sono state valutate *in silico* e per via sperimentale utilizzando diversi materiali di partenza come ceppi di riferimento certificati, RNA/DNA di riferimento certificati e materiali provenienti da programmi EQA (External Quality Assurance).

12.5.1. Specificità analitica

La specificità analitica è la capacità del test di rilevare il target previsto. Per la specificità analitica devono essere considerate quattro componenti: la reattività crociata, la coinfezione, l'interferenza di agenti microbici e l'interferenza di sostanze. La reattività crociata può verificarsi quando nel campione di un paziente sono presenti microrganismi geneticamente correlati, mentre l'interferenza microbica può verificarsi se tali microrganismi geneticamente correlati alterano il rilevamento dei microrganismi target eventualmente presenti. Allo stesso modo, lo studio della coinfezione mira a valutare se i microrganismi target a diverse concentrazioni nello stesso campione possano alterare il rilevamento reciproco. Infine, l'interferenza di sostanze può avvenire se la presenza di sostanze specifiche potenzialmente presenti nella matrice del campione influenza le prestazioni del test qPCR.

Analisi *in silico* della reattività crociata

La reattività crociata è stata valutata utilizzando sequenze di riferimento dei patogeni provenienti da NCBI Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e con strumenti di allineamento come BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), un software di analisi bioinformatica interno.

I risultati da mostrare presentano solo le sequenze con una percentuale di omologia superiore all'80%. Le sequenze allineate con una percentuale di allineamento inferiore all'80% di omologia sono state considerate di improbabile rivelazione.

Treponema pallidum

Tutte le sequenze analizzate presentavano una percentuale di omologia inferiore all'80% per i set di primer e sonde di *T. pallidum*.

L'analisi della reattività crociata *in silico* ha rivelato un'omologia del 100% con *Treponema paraluiscluniculi* (Taxid ID: 53435 e 545766). Tuttavia, secondo una ricerca NCBI, queste sequenze sono risultate eterotipiche o sinonimi tassonomici e corrispondono anche a *Treponema pallidum*.

Pertanto, nessuna delle sequenze analizzate, incluse quelle che presentano una percentuale di omologia superiore all'80%, può influire sul rilevamento corretto del *Treponema pallidum*.

Herpesvirus alfa umano 1

Tutte le sequenze analizzate presentavano una percentuale di omologia inferiore all'80% per i set di primer e sonde dell'HSV-1.

L'analisi della reattività crociata *in silico* ha rivelato un'omologia del 98,33% con il ceppo 105640 di herpesvirus alfa-1 dello scimpanzé (Taxid ID: 332937). L'ospite di questo ceppo di herpesvirus alfa è lo scimpanzé (*Pan troglodytes*). Gli herpesvirus sono altamente specifici per l'ospite e condividono un'evoluzione sincrona di lunga data con i loro ospiti. Questo virus non è stato identificato nell'uomo e al momento non è considerato un virus zoonotico, quindi non interferisce nel rilevamento dell'HSV-1.

Pertanto, nessuna delle sequenze analizzate, incluse quelle che presentano una percentuale di omologia superiore all'80%, può influire sul corretto rilevamento dell'HSV-1.

Herpesvirus alfa umano 2

Tutte le sequenze analizzate presentavano una percentuale di omologia inferiore all'80% per i set di primer e sonde dell'HSV-2.

In conclusione, i design target HSV-1, HSV-2 e *T. pallidum* di VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System non dovrebbero causare falsi positivi nel rilevamento di *Treponema pallidum*, herpesvirus alfa umano 1 e herpesvirus alfa umano 2 quando sono presenti altri organismi.

Specificità analitica: prova sperimentale

Reattività crociata: prova sperimentale

La reattività crociata di VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System è stata confermata testando un pannello di diversi microrganismi associati a sintomi di infezioni sessualmente trasmissibili o microrganismi rilevanti dal punto di vista ambientale e filogenetico. Quando possibile e in presenza di dati sulla concentrazione, i microrganismi interferenti sono stati valutati a livelli di rilevanza medica (di solito 1E+05 - 1E+06 CFU (unità formanti colonia)/mL per i batteri/funghi e 1E+04 - 1E+05 PFU (unità formanti placca)/mL per i virus). Non è stata rilevata alcuna reattività crociata tra i microrganismi analizzati riportati di seguito, eccetto che per i microrganismi target.

Test di reattività crociata					
<i>Acinetobacter baumannii</i> 5377 [NCDC KC 755]	-	Haemophilus influenzae ceppo L-378	-	<i>Listeria monocytogenes</i> sierovariante 4b	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius 1863 CECT 2071	-	Hepatitis A HM175/18f	-	Virus del vaiolo delle scimmie	-
<i>Atopobium vaginae</i>	-	Virus Herpes simplex tipo 1 1st WHO IS for HSV-1	+	<i>Mycoplasma genitalium</i> ceppo M30	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Virus Herpes simplex tipo 2 1st WHO IS for HSV-2	+	<i>Mycoplasma hominis</i> ceppo LBD-4	-
<i>Candida albicans</i>	-	Virus Herpes 2 ceppo MS	+	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ceppo NCTC 8375 [B 5025]	-
<i>Candida glabrata</i>	-	Herpesvirus umano 1 ceppo HF	+	<i>Neisseria meningitidis</i> ceppo M2091	-
<i>Candida krusei</i> Issatchenkia orientalis Kudryavtsev 1960 CECT 1433	-	Herpesvirus umano 1 ceppo F	+	<i>Proteous mirabilis</i> NCDC 2059-70	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	Herpesvirus umano 1 ceppo KOS (ATCC-VR-1493)	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ceppo RH 815	-
<i>Candida tropicalis</i> (Castellani) Berkhout 1923 CECT 1005	-	Herpesvirus umano 1 ceppo MacIntyre	+	<i>Serratia marcescens</i> sottosp. marcescens	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> sierovariante E	-	Herpesvirus umano 2 ceppo ATCC-2011-2	+	<i>Staphylococcus aureus</i> sottosp. Aureus, ceppo Seattle 1945	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Herpesvirus umano 2 ceppo G	+	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ceppo 810-2	-
<i>Enterobacter cloacae</i> sottosp. cloacae	-	Papillomavirus umano 16	-	<i>Treponema pallidum</i> DNA Control, Vircell	+
<i>Enterococcus faecalis</i> ceppo tipo CECT 8120	-	Papillomavirus umano 18	-	<i>Treponema pallidum</i> ceppo Nichols	+
<i>Enterococcus faecium</i> vanA, ceppo CECT 5253	-	<i>Klebsiella oxytoca</i> ceppo MIT 10-5243	-	<i>Treponema pallidum</i> ceppo SS14	+
Virus Epstein-Barr 1st WHO IS for Epstein-Barr Virus EBV	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ceppo UHKPC57	-	<i>Trichomonas vaginalis</i> , QCMD TV18S-01	-
<i>Escherichia coli</i> ceppo tipo	-	<i>Listeria innocua</i>	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i> T- ceppo 960 (CX8) [960, CIP 103755, NCTC 10177]	-
<i>Gardnerella vaginalis</i> 594 [NCTC 10287]	-	<i>Listeria ivanovii</i> sottosp. londoniensis	-	Virus varicella zoster ceppo Ellen	-
<i>Haemophilus ducreyi</i> classe I	-	<i>Listeria monocytogenes</i> sierovariante 1/2	-		

Tabella 23. Microrganismi patogeni di riferimento inclusi nel test di reattività crociata. Il risultato +/- si riferisce al risultato positivo o negativo ottenuto nei diversi canali a seconda del target rilevato. Nel caso in cui un microrganismo testato sia uno dei target rilevati dal dispositivo, si ottiene un risultato positivo nel canale corrispondente, ma un risultato negativo negli altri canali.

In conclusione, i risultati dei test di reattività crociata indicano un'elevata specificità di VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, riducendo al minimo il rischio di risultati falsi positivi. Poiché non sono state osservate amplificazioni non specifiche con altri microrganismi correlati, ciò suggerisce che il dispositivo sia in grado di distinguere accuratamente i target.

Studio di coinfezione

È stato condotto uno studio sulla coinfezione utilizzando Herpesvirus umano 1, ceppo KOS (ATCC® VR-1493, Cod. FR-310 (IRR)), virus Herpes simplex tipo 2, ceppo MS (Cod. 0810006CF (Zeptomatrix)) e *Treponema pallidum*, ceppo SS14 (Washington University) a diverse concentrazioni, per confermare che la presenza di uno qualsiasi di essi, indipendentemente dalla concentrazione, non altera il rilevamento reciproco. Sono stati analizzati tre campioni naturali a matrice negativa di lesione cutanea addizionati con il materiale di riferimento, un target a bassa concentrazione (3xLoD) e gli altri target a concentrazione molto alta, solitamente 1E+04 - 1E+05 unità/mL, se possibile.

I risultati confermano che il rilevamento dei microrganismi target non è alterato quando viene analizzato con VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System in caso di coinfezione a diverse concentrazioni.

Studio degli agenti microbici interferenti

È stato condotto uno studio sull'interferenza microbica per analizzare i potenziali agenti microbici interferenti per VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. È stato testato un pannello di diversi microrganismi rilevanti dal punto di vista clinico, ambientale e filogenetico in presenza di target di HSV-1, HSV-2 e *T. pallidum* utilizzando una matrice naturale negativa di lesione cutanea addizionata con Herpesvirus umano 1, ceppo KOS (ATCC® VR-1493, Cod. FR-310 (IRR)), virus Herpes simplex tipo 2, ceppo MS (Cod. 0810006CF (Zeptomatrix)) e *Treponema pallidum*, ceppo SS14 (Washington University). Quando possibile e in presenza di dati sulla concentrazione, il virus, i batteri e/o i funghi interferenti sono stati valutati a livelli di rilevanza medica (di solito 1E+05 - 1E+06 CFU/mL per i batteri/funghi e 1E+04 - 1E+05 PFU/mL per i virus).

Un controllo di matrice positiva (Positive Matrix Control, PMC) e un controllo di matrice negativa (Negative Matrix Control, NMC) sono inclusi come controlli del test. Il PMC corrisponde alla matrice negativa addizionata con ceppi target specifici senza alcun agente microbico interferente, mentre il NMC corrisponde alla matrice negativa senza alcun agente microbico interferente.

Nome del microrganismo	Concentrazione testata	Risultato
PMC	N/A	N.I
NMC	N/A	N.I
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Non disponibile	N.I
<i>Atopobium vaginae</i>	4,52E+03 CFU/μL	N.I
<i>Candida albicans</i>	4,18E+03 CFU/μL	N.I
<i>Candida glabrata</i>	2,46E+03 CFU/μL	N.I
<i>Candida parapsilosis</i>	Non disponibile	N.I
<i>Candida tropicalis</i>	3,04E+04 cp/μL	N.I
<i>Chlamydia trachomatis sierovariante E</i>	3,20E+06 IFU/mL	N.I
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,28E+03 CFU/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 CFU/mL	N.I
<i>Haemophilus ducreyi</i> classe I	1,40E+02 cp/μL	N.I
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,20E+03 CFU/μL	N.I
Hepatitis A	2,80E+03 TCID50/μL	N.I
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Non disponibile	N.I
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Non disponibile	N.I
<i>Listeria innocua</i>	Non disponibile	N.I
<i>Listeria ivanovii</i> sottosp. londoniensis	Non disponibile	N.I
<i>Listeria monocytogenes</i> (CECT 4031)	2,90E+03 CFU/μL	N.I
<i>Listeria monocytogenes</i> (CECT 935)	2,70E+03 CFU/μL	N.I
<i>Mycoplasma hominis</i>	4,40E+03 CFU/μL	N.I
<i>Mycoplasma genitalium</i>	3,80E+03 CFU/μL	N.I
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6,20E+03 CFU/μL	N.I
<i>Neisseria meningitidis</i>	5,70E+04 CFU/μL	N.I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,90E+04 CFU/μL	N.I
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,60E+04 CFU/μL	N.I
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	9,20E+03 CFU/μL	N.I
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	2,00E+04 CFU/μL	N.I
<i>Acinetobacter baumannii</i> 5377 [NCDC KC 755]	8,10E+05 CFU/mL	N.I
<i>Bacteroides fragilis</i>	3,40E+02 cp/μL	N.I
<i>Enterococcus faecalis</i> ceppo tipo	5,00E+05 CFU/mL	N.I
<i>Enterococcus faecium</i> vanA	3,50E+05 CFU/mL	N.I
Papillomavirus umano 16	1,00E+03 UI/μL	N.I
Papillomavirus umano 18	1,00E+03 UI/μL	N.I
<i>Serratia marcescens</i>	2,30E+05 CFU/mL	N.I
Virus varicella zoster	7,26E+04 CFU/mL	N.I
<i>Citrobacter freundii</i> ceppo tipo	6,20E+02 CFU/μL	N.I
<i>Escherichia coli</i> ceppo tipo	5,20E+02 CFU/μL	N.I
<i>Proteus mirabilis</i>	2,55E+01 CFU/μL	N.I
Virus del vaiolo delle scimmie	1,50E+03 cp/mL	N.I

Tabella 24. Studio degli agenti microbici interferenti. N.I. = Nessuna interferenza, (PMC, Positive Matrix Control) = controllo di matrice positiva, (NMC, Negative Matrix Control) = controllo di matrice negativa, (TCID50): dose infettante che produce effetti nel 50% delle colture tissutali, (UI): unità internazionali, (CFU): unità formanti colonia, (cp): copie, (IFU): unità infettiva.

In conclusione, non è stata osservata alcuna interferenza nel rilevamento dell'acido nucleico target con nessuno dei microrganismi testati.

Studio delle sostanze interferenti

È stato condotto uno studio sulle sostanze interferenti per analizzare il potenziale effetto di interferenza delle sostanze endogene ed esogene su VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Sono state aggiunte 22 sostanze potenzialmente interferenti alla matrice naturale negativa di lesione cutanea addizionata con i ceppi di riferimento: Herpesvirus umano 1, ceppo KOS (ATCC® VR-1493, Cod. FR-310 (IRR)), virus Herpes simplex Tipo 2, ceppo MS (Cod. 0810006CF (Zeptomatrix)) e *Treponema pallidum*, ceppo SS14 (Washington University) e valutate con sei repliche.

Un controllo di matrice positiva (Positive Matrix Control, PMC) e un controllo di matrice negativa (Negative Matrix Control, NMC) sono inclusi come controlli del test. Il PMC corrisponde alla matrice negativa addizionata con ceppi target specifici senza sostanze interferenti, mentre il NMC corrisponde alla matrice negativa senza sostanze interferenti né addizionata con microrganismi/materiale di riferimento. Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Nome della sostanza	Concentrazione testata	Risultato
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.
Sangue intero	1,00E+00% (v/v)	N.I.
Leucociti/monociti	1,00E+06 cellule/mL	N.I.
Mucina	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Clamiox (idrocortisone)	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Neosayomol (difenidramina)	3,87E-02 mg/mL	N.I.
Letibalm (balsamo labbra)	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Caseina	7,00E+00 mg/mL	N.I.
Hemoal (benzocaina)	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Durex Frescor	5,00E+01 µL/mL	N.I.
SOIVRE Idratante vaginale	5,00E+01 µL/mL	I
	1,25E+01 µL/mL	N.I.
Liade (pomata antibiotica)	7,20E+00 mg/mL	N.I.
Urina femminile	1,00E+01% (v/v)	N.I.
Urina maschile	1,00E+01% (v/v)	N.I.
Feci	2,20E-01% (v/v)	N.I.
Liquido seminale	5,00E+00% (v/v)	N.I.
Halibut (crema)	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Vagisil Crema	7,50E-01 mg/mL	N.I.
Amido di mais	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.
Tioconazolo	2,50E+00 mg/mL	N.I.

Tabella 25. Sostanze potenzialmente interferenti. N.I.: nessuna interferenza segnalabile / I: interferente.

Diverse sostanze potenzialmente interferenti, sia endogene che esogene, sono state testate su VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. L'interferenza è stata osservata testando SOIVRE Idratante vaginale a 50 µL/mL e Talquistina al 2,64% (v/v). Le diluizioni sono state eseguite fino al raggiungimento della concentrazione alla quale questi effetti di interferenza non erano più osservabili: 12,5 µL/mL per SOIVRE Idratante vaginale e 0,17% (v/v) per Talquistina. I risultati ottenuti portano a concludere che, alle concentrazioni finali testate, non si osserva alcuna interferenza delle sostanze valutate.

12.5.2. Reattività analitica

La reattività analitica può essere definita come la percentuale di ceppi microbici target o di campioni di DNA/RNA che danno il risultato positivo corretto. La reattività analitica è stata studiata *in silico* e mediante analisi sperimentale.

Analisi *in silico* della reattività analitica

La reattività analitica di VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System è stata valutata utilizzando banche dati di sequenze nucleotidiche di pubblico dominio come NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), e un software di analisi bioinformatica interno per dimostrare che i geni target possono essere rilevati correttamente dal dispositivo in fase di studio. L'analisi *in silico* del design di primer e sonde è stata eseguita attraverso l'allineamento rispetto a un totale di 4.941 sequenze analizzate (sequenze scaricate dalla banca dati con duplicati rimossi) per *T. pallidum*, 9.779 per HSV-1 e 8.689 per HSV-2. I risultati ottenuti sono mostrati nella seguente tabella:

<i>Treponema pallidum</i>					
Gene	Sequenze allineate: 607				
	Senza mismatch	Con mismatch	Sequenze con rilevamento confermato	Sequenze senza rilevamento	Sequenze con rilevamento non noto
<i>16S rRNA</i>	99,84%	0,16%	99,84%	0%	0,16%
Herpesvirus alfa umano 1					
Gene	Sequenze allineate: 513				
	Senza mismatch	Con mismatch	Sequenze con rilevamento confermato	Sequenze senza rilevamento	Sequenze con rilevamento non noto
<i>UL1</i>	87,33%	12,67%	97,66%	0%	2,34%
Herpesvirus alfa umano 2					
Gene	Sequenze allineate: 549				
	Senza mismatch	Con mismatch	Sequenze con rilevamento confermato	Sequenze senza rilevamento	Sequenze con rilevamento non noto
<i>US4</i>	93,44%	6,56%	93,44%	0%	6,56%

Tabella 26. Analisi *in silico* della reattività analitica. "Sequenze allineate" = numero di sequenze allineate senza o con mismatch rispetto al totale delle sequenze analizzate, "Sequenze con rilevamento confermato" = sequenze senza mismatch o analizzate a umido il cui rilevamento è garantito, "Sequenze senza rilevamento" = sequenze precedentemente analizzate *in silico* il cui rilevamento sperimentale non può essere garantito a causa di precedenti evidenze sperimentali negative, "Sequenze con rilevamento non noto" = sequenze precedentemente analizzate *in silico* il cui rilevamento sperimentale non può essere garantito per mancanza di evidenze sperimentali.

In sintesi, l'analisi di inclusività ha dimostrato un rilevamento corretto dei geni *16S rRNA*, *UL1* e *US4* rispettivamente di *T. pallidum*, HSV-1 e HSV-2, con il VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

Reattività analitica: prova sperimentale

La reattività analitica di VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System per HSV-1 è stata valutata rispetto al DNA di Herpesvirus umano 1, ceppo HF (codice ATCC VR-260), Herpesvirus umano 1, ceppo MacIntyre (codice ATCC VR-539), Herpesvirus umano 1, ceppo F (codice ATCC VR-733) e 1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-1 (HSV-1) (NIBSC 16/368), mostrando risultati positivi.

La reattività analitica di VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System per HSV-2 è stata valutata rispetto al DNA di Herpesvirus umano 2, ceppo G (codice ATCC VR-3393), Herpesvirus umano 2, ceppo ATCC-2011-2 (codice ATCC VR-1779) e 1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-2 (HSV-2) (NIBSC 17/122), mostrando risultati positivi.

La reattività analitica di VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System per *T. pallidum* è stata valutata rispetto al DNA di *Treponema pallidum*, ceppo Nichols (University of Washington) e *Treponema pallidum* DNA Control (Vircell MBC109), mostrando risultati positivi.

12.6. Tracciabilità metrologica

Questo test non è stato progettato con finalità di misurazione.

13. Caratteristiche di prestazione clinica

La prestazione clinica di VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System è stata testata utilizzando campioni di tamponi di lesioni cutanee anogenitali e orali raccolti dal personale infermieristico utilizzando Copan eSwab®. Per il prelievo, il tampone sterile (FLOQSwab) è stato inserito nella fiala in dotazione contenente 1 mL di Copan Liquid Amies Elution Swab. I risultati sono stati i seguenti:

	Sito	Tipo di campione	Flusso di lavoro	Target
1	Certest Biotec S.L. (Saragozza, Spagna) in collaborazione con l'Hospital Universitario Miguel Servet (Saragozza, Spagna) utilizzando campioni del Biobanco del Sistema de Salud de Aragón (BSSA)	Tampone di lesione cutanea anogenitale e orale (Studio retrospettivo)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	HSV-1
				HSV-2
				<i>T. pallidum</i>
2	Certest Biotec S.L. (Saragozza, Spagna) utilizzando campioni di Cerbera Xpert	Tampone di lesione cutanea anogenitale e orale (Studio retrospettivo)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	HSV-1
				HSV-2
				<i>T. pallidum</i>

Tabella 27. Sito, tipo di campione, flusso di lavoro e target.

Sono stati calcolati i valori veri positivi e veri negativi, i valori falsi positivi e falsi negativi, la sensibilità, la specificità, i valori predittivi positivi (PPV) e predittivi negativi (NPV) e i rapporti di probabilità (LR) di VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. I risultati e l'analisi dei diversi studi sono stati raccolti in un unico valore di riferimento, poiché entrambi gli studi hanno utilizzato lo stesso metodo di riferimento, lo stesso tipo di campioni e gli stessi criteri di inclusione/esclusione. I risultati sono mostrati nella seguente tabella:

Sito	Test di confronto	Target	TP	TN	FP	FN	Sensibilità	Specificità	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)
		<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)













Tabella 28. Valori positivi (TP) e negativi (TN) reali, valori falsi positivi (FP) e falsi negativi (FN), sensibilità, specificità, valori predittivi positivi (PPV), valori predittivi negativi (NPV) e rapporti di probabilità (LR) di VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

In conclusione, i risultati mostrano un'elevata concordanza nel rilevare HSV-1, HSV-2 e *T. pallidum* utilizzando VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

Bibliografia

- 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., Šmajš, 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 per reagenti e componenti IVD

 Dispositivo per uso diagnostico <i>in vitro</i>	 Mantenere asciutto	 Usare entro	 Fabbricante	 Codice del lotto
 Consultare le istruzioni per l'uso	 Limitazione della temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> test	 Identificazione unica del dispositivo	 Numero di catalogo
 Marcatura CE	 Tenere lontano dalla luce del sole			

Marchi commerciali

BD MAX™ è un marchio commerciale registrato di Becton, Dickinson and Company.

Diritti di modifica riservati. Tutti i diritti riservati. © Certest Biotec, S.L.

Tutti gli altri marchi che possono apparire in questo foglietto illustrativo sono di proprietà dei rispettivi proprietari.



Certest Biotec, S.L.

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

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

Informazioni sullo sponsor in Australia: Becton Dickinson Pty Ltd., 66 Waterloo Road.
Macquarie Park NSW 2113, Australia

Informazioni sullo sponsor in Nuova Zelanda: Becton Dickinson Limited, 14B George Bourke Drive.
Mt. Wellington Auckland 1060, Nuova Zelanda

Controllo modifiche		
Versione N.	Modifiche	Data
00	Versione originale. Questa versione è una traduzione del documento originale in inglese: IUo-444222en0725.00.	27/07/2025

Tabella A2. Tabella di controllo delle modifiche.

Revisione: 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.