

Real Time PCR Detection Kit

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

CE IVD
2797

Niniejsza instrukcja użytkowania ma zastosowanie do następujących referencji:

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

Tabela A 1. Numer referencyjny produktu, który należy stosować razem z systemem 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.

Jeżeli żądana wersja językowa nie znajduje się na liście, należy odwiedzić stronę certest.es/viasure/labeling. Jeżeli żądana wersja językowa nie znajduje się na stronie internetowej, należy napisać na adres: viasure@certest.es.

Uwaga: Użytkownik powinien powiadomić producenta oraz kompetentny organ Państwa Członkowskiego, na terenie którego ma siedzibę użytkownik i/lub pacjent, o wszelkich poważnych incydentach powiązanych z tym produktem.

Spis treści

1. Przewidziane zastosowanie.....	6
2. Podsumowanie i objaśnienia	6
3. Zasada działania procedury	8
4. Dostarczane odczynniki	9
5. Odczynniki i sprzęt, które powinien zapewnić użytkownik	9
6. Warunki transportu, przechowywania i użytkowania	10
7. Środki ostrożności dla użytkowników.....	10
8. Procedura testowa	12
8.1. Pobieranie, transport i przechowywanie próbek.....	12
8.2. Przygotowanie próbki i ekstrakcja DNA	14
8.3. Protokół PCR.....	14
8.3.1. Tworzenie programu testu PCR dla testu VIASURE <i>HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum</i> Assay for BD MAX™ System	14
8.3.2. Ustawienie statywu BD MAX™	18
8.3.3. Konfiguracja instrumentu BD MAX™	19
8.3.4. Raport wyników z BD MAX™ System	20
9. Interpretacja wyników	20
10. Ograniczenia testu	22
11. Kontrola jakości	24
12. Charakterystyki skuteczności analitycznej	25
12.1. Liniowość analityczna	25
12.2. Czułość analityczna.....	26
12.2.1. Granica wartości tła (LoB)	26
12.2.2. Granica wykrywalności (LoD).....	26
12.3. Zakres pomiarowy	27
12.4. Dokładność	27
12.4.1. Prawdziwość.....	27
12.4.2. Precyzja.....	28

12.4.3.	Dokładność	31
12.5.	Swoistość i reaktywność analityczna	31
12.5.1.	Swoistość analityczna	31
12.5.2.	Reaktywność analityczna	38
12.6.	Spójność metrologiczna.....	39
13.	Charakterystyki skuteczności klinicznej	39
	Bibliografia.....	41
	Symbole składników i odczynników do diagnostyki <i>in vitro</i> (IVD)	42
	Znaki towarowe.....	42

POLSKI

1. Przewidziane zastosowanie

Test VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System to zautomatyzowany test qPCR przeznaczony do jednoczesnego jakościowego wykrywania DNA wirusa opryszczki pospolitej (Herpes simplex) typu 1 (HSV-1), wirusa opryszczki pospolitej typu 2 (HSV-2) i krętka bladego (*Treponema pallidum*, kiłę) w wymazach ze zmian skórnych okolic anogenitalnych i jamy ustnej u pacjentów, u których ich lekarz podejrzewa zakażenie wirusem HSV-1, wirusem HSV-2 i bakterią *T. pallidum*. Test ten jest przeznaczony do wspomagania rozpoznawania zakażenia wymienionymi powyżej mikroorganizmami w połączeniu z klinicznymi objawami przedmiotowymi i podmiotowymi i/lub epidemiologicznymi czynnikami ryzyka. Wyniki dodatnie wskazują na obecność kwasu nukleinowego (ang. nucleic acid, NA) obiektu docelowego, ale nie wykluczają obecności innych czynników chorobotwórczych, które nie są wykrywane przez ten test. Wyniki ujemne nie wykluczają obecności docelowych kwasów nukleinowych i nie należy ich używać jako jedynej podstawy podejmowania decyzji dotyczących leczenia bądź innych decyzji dotyczących postępowania z pacjentem. Przy oznaczeniu wykorzystywany jest BD MAX™ System do zautomatyzowanej ekstrakcji DNA, a następnie test qPCR z wykorzystaniem dostarczonych odczynników w połączeniu z uniwersalnymi odczynnikami i materiałami jednorazowymi przeznaczonymi do stosowania z BD MAX™ System. DNA jest ekstrahowane z próbek, amplifikowane za pomocą testu qPCR i wykrywane za pomocą primerów i sond z fluorescencyjnym barwnikiem reporterowym swoistych dla wirusa HSV-1, wirusa HSV-2 i *T. pallidum*.

Produkt jest przeznaczony do stosowania przez wykwalifikowany i przeszkolony personel laboratorium klinicznego, który został specjalnie poinstruowany i przeszkolony w zakresie metod PCR w czasie rzeczywistym oraz procedur diagnostycznych in vitro (w tym przeszkolony pod kątem korzystania z przyrządu do PCR w czasie rzeczywistym (termocykler) i systemu do ekstrakcji kwasu nukleinowego).

2. Podsumowanie i objaśnienia

Ludzkie wirusy opryszczki pospolitej (HSV) typu 1 i 2 to jedne z najczęściej występujących na świecie wirusów ludzkich, które są powszechnie kojarzone z takimi chorobami, jak opryszczka wargowa, opryszczka narządów płciowych, opryszczkowe zapalenie rogówki, zapalenie opon mózgowych i zapalenie mózgu (Zhu i Viejo-Borbolla, 2021). Wirus HSV atakuje przede wszystkim skórę i błony śluzowe, powodując uporczywe zakażenia z okresami uśpienia (utajenia) oraz nawrotu (wznowy) choroby (Cole, 2020; Minaya i wsp., 2017). Przenoszenie zarówno wirusa HSV-1, jak i HSV-2 odbywa się poprzez kontakt oralny, przy czym zakażenia wirusem HSV-2 występują później, zazwyczaj poprzez kontakt seksualny, a objawy kliniczne tych wirusów są wysoce zróżnicowane: od niewystępujących (postać bezobjawowa) po łagodne lub zagrażające życiu (Cole, 2020; Światowa Organizacja Zdrowia, 2023; Zhu i Viejo-Borbolla, 2021). U większości osób z prawidłowo działającym układem odpornościowym wirus HSV powoduje występowanie łagodnej i

samoistnie ustępującej postaci tej choroby (Zhu i Viejo-Borbolla, 2021). Jednak zakażenie wirusem HSV jest również związane z wysoką zachorowalnością i śmiertelnością u niektórych osób, takich jak pacjenci z obniżoną odpornością, u których występuje nawracające zakażenie wirusem HSV (Cole, 2020; Zhu i Viejo-Borbolla, 2021). Zauważono, że zakażenie jednym typem wirusa HSV zazwyczaj powoduje wytworzenie się odporności, która zapobiega ponownemu zakażeniu tym samym serotypem, ale nie innym (Zhu i Viejo-Borbolla, 2021).

Krętek *Treponema pallidum* uznaje się za czynnik wywołujący kiłę weneryczną, malinię, kiłę endemiczną i pintę, które są zakażeniami wieloetapowymi i można je odróżnić jedynie na podstawie kryteriów klinicznych, epidemiologicznych i geograficznych (Mercuri i wsp., 2022; Peeling i wsp., 2023; Radolf i wsp., 2016; Tudor i wsp., 2022). Bakteria *T. p. pertenue* jest związana z występowaniem malinicy, *T. carateum* z występowaniem pinty, a *T. p. endemicum* – kiły endemicznej, natomiast subsp. *pallidum* bakterii *T. pallidum* jest jedynym podgatunkiem związanym z występowaniem kiły wenerycznej (Mercuri i wsp., 2022; Tudor i wsp., 2022).

Kiła przebiega wieloetapowo, przy czym na każdym jej etapie występują różne objawy przedmiotowe i podmiotowe, takie jak owrzodzenia twarde w przypadku kiły pierwotnej oraz wysypka lub owrzodzenia w przypadku kiły wtórnej (CDC, 2023; Mercuri i wsp., 2022; Peeling i wsp., 2023). Ze względu na różnorodność objawów klinicznych kiła nazywana jest „wielkim naśladowcą” (Peeling i wsp., 2023; Tudor i wsp., 2022). Choroba ta występowała na przestrzeni lat w różnych populacjach wysokiego ryzyka, a choć w 1998 roku była bliska wyeliminowania, od 2000 roku częstość jej występowania zaczęła wzrastać (Mercuri i wsp., 2022).

Zawsze zaleca się wykonywanie testów pozwalających odróżnić wirusa HSV-1 od HSV-2, ponieważ wpływa to zarówno na rokowanie, jak i na leczenie. Amerykańska rządowa agencja epidemiologiczna CDC zaleca potwierdzanie rozpoznania klinicznego za pomocą testów wirusologicznych i serologicznych swoistych dla danego typu wirusa (Cole, 2020). Rzetelną laboratoryjną metodą diagnozowania ostrych zakażeń narządów płciowych wywoływanych przez HSV jest wykrywanie DNA wirusa HSV-1 i HSV-2 za pomocą metody reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) (Cole, 2020). W przypadku bakterii *T. pallidum* na potrzeby diagnostyki laboratoryjnej stosuje się wykrywanie bezpośrednie i badania serologiczne, ponieważ tego czynnika chorobotwórczego nie można wyhodować (Forrestel i wsp., 2020). Testy serologiczne nie są jednak w stanie odróżnić kiły od innych zakażeń krętkowych ze względu na wysokie podobieństwo genetyczne krętków chorobotwórczych (Forrestel i wsp., 2020). Techniki amplifikacji kwasów nukleinowych takie jak PCR umożliwiają wykrywanie DNA bakterii w próbkach klinicznych we wczesnych stadiach choroby, co ze względu na ich wysoką czułość może stanowić potencjalną strategię zwalczania epidemii kiły (Peeling i wsp., 2023).

3. Zasada działania procedury

Test VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System jest przeznaczony do jednoczesnego jakościowego wykrywania DNA wirusa opryszczki pospolitej (Herpes simplex) typu 1 (HSV-1), wirusa opryszczki pospolitej (Herpes simplex) typu 2 (HSV-2) i bakterii *Treponema pallidum* (kiłę) w wymazach ze zmian skórnych okolic anogenitalnych i jamy ustnej. Po wyizolowaniu DNA identyfikacja wirusa HSV-1, wirusa HSV-2 i bakterii *T. pallidum* odbywa się poprzez amplifikację konserwatywnego regionu genu *UL1 kodującego glikoproteinę L* w przypadku wirusa HSV-1, genu *US4 kodującego glikoproteinę G* w przypadku wirusa HSV-2 oraz genu *16S rRNA* bakterii *T. pallidum* z użyciem swoistych primerów i sond z fluorescencyjnymi oznaczeniami.

Działanie testu VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System opiera się na aktywności egzonukleazy 5' w polimerazie DNA. Podczas amplifikacji DNA ten enzym odrywa sondę powiązaną z komplementarną sekwencją DNA, oddzielając wygaszacz od barwnika reporterowego. Reakcja ta generuje wzrost sygnału fluorescencyjnego, który jest proporcjonalny do ilości docelowego wzorca. Ta fluorescencja jest mierzona za pomocą BD MAX™ System.

Test VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System zawiera w każdej probówce wszystkie elementy niezbędne do wykonania oznaczenia PCR w czasie rzeczywistym (swoiste primery/sondy, dNTPs, bufor, polimeraza) w postaci stabilizowanej¹ oraz wewnętrzną kontrolę endogenną (EIC) (gen ludzkiej *RNAse P*), aby móc sprawdzić integralność próbki, monitorować proces ekstrakcji i/lub odrzucić hamowanie aktywności polimerazy. Ludzkie geny porządkowe biorą udział w podstawowych komórkowych czynnościach porządkowych i w związku z tym oczekuje się, że będą występować we wszystkich ludzkich komórkach jądrazastych oraz zachowywać względnie stałe poziomy ekspresji.

Wykrywany element	Kanał	Gen
HSV-1	475/520	Gen <i>UL1 kodujący glikoproteinę L</i>
HSV-2	530/565	Gen <i>US4 kodujący glikoproteinę G</i>
<i>T. pallidum</i>	630/665	Gen <i>16S rRNA</i>
Endogenna kontrola wewnętrzna (EIC)	585/630	Rybonukleaza <i>RNAse P</i>

Tabela 1. Element wykrywany, kanał i geny.

¹ Należy zauważyć, że określenia „stabilizowany” i „liofilizowany” są używane zamiennie w całym dokumencie (jako synonimy).

4. Dostarczane odczynniki

Test VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System zawiera następujące materiały i odczynniki wyszczególnione w Tabeli 2:

Odczynnik/materiał	Opis	Zakres stężenia	Kod	Ilość
<i>HSV-1</i> , <i>HSV-2</i> & <i>Treponema pallidum</i> reaction tube	Lioprotektory i stabilizatory	±6 g/100 ml*	Folia 1E	2 woreczki po 12 przezroczystych probówek
	Trifosforan nukleotydu (dNTP)	±1 mM*		
	Primery i sondy	0,2-1 nmol/μL*		
	Enzymy	10-100 U/reakcję*		
Rehydration Buffer tube (probówka z buforem do rehydratacji)	Mieszanina roztworu soli fizjologicznej	± 13 mM	Folia 11	1 woreczek z 24 przezroczystymi probówkami
	Bufor (TRIS, pH)	± 67 mM		

Tabela 2. Odczynniki i materiały wchodzące w skład testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, nr ref. Nr 444222.

* W przypadku składnika w postaci stabilizowanej, zakres stężenia dotyczy stanu po uwodnieniu.

5. Odczynniki i sprzęt, które powinien zapewnić użytkownik

Poniżej wymieniono materiały, których użycie jest wymagane, ale które nie wchodzą w skład testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

- Przyrząd do PCR w czasie rzeczywistym: BD MAX™ System (nr ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (nr ref.:442827 lub 442828).
- Wkłady do PCR – BD MAX™ PCR Cartridges (nr ref.: 437519).
- Worteks.
- Mikropipety (dokładność w zakresie 2–1000 μl)
- Woda wolna od nukleaz.
- końcówki z filtrem.
- Bezpudrowe rękawice jednorazowe.

Opcjonalnie:

- Materiały kontroli zewnętrznej można stosować w ramach procedury kontroli jakości testu. Dostępny w handlu materiał kontrolny i/lub próbki wcześniej scharakteryzowane jako dodatnie lub ujemne można stosować jako zewnętrzną kontrolę dodatnią (EPC) lub zewnętrzną kontrolę ujemną (ENC), odpowiednio. Wybór i zatwierdzenie EPC i ENC musi być zgodne z obowiązującymi przepisami lokalnymi, stanowymi i/lub federalnymi oraz standardowymi procedurami kontroli jakości w laboratorium. Dodatkowo, przy wykorzystaniu dostępnego w handlu materiału kontrolnego, użytkownik musi postępować zgodnie z odpowiednią instrukcją użytkowania.

6. Warunki transportu, przechowywania i użytkowania

- Zestawy można przysyłać i przechowywać w temperaturze 2–30°C do upływu terminu ważności podanego na etykiecie zestawu.
- Unikać drgań podczas transportu, aby zapobiec wyciekowi cieczy.
- Po otwarciu aluminiowych woreczków zawierających probówki reakcyjne, produkt można stosować w ciągu maksymalnie 28 dni w temperaturze 2–30°C. Chronić fiolkę przed światłem.

Poniższa tabela podsumowuje warunki transportu, przechowywania i użytkowania całego zestawu i każdego składnika:

Składnik	Warunki transportu	Warunki przechowywania	Warunki użytkowania
Cały test VIASURE <i>HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum</i> Assay for BD MAX™ System	2–30°C przez okres trwałości podany na etykiecie zestawu.	Przed użyciem: 2–30°C przez okres trwałości podany na etykiecie zestawu.	* Patrz warunki użytkowania każdego składnika.
<i>HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum</i> reaction tube (folia 1E)		Przed użyciem: 2–30°C przez okres trwałości podany na etykiecie zestawu. Po otwarciu woreczka z żelem krzemionkowym: 2–30°C, przez maksymalnie 28 dni.	Temperatura pokojowa.
Rehydration Buffer tube (probówka z buforem do rehydracji)		Przed użyciem: 2–30°C przez okres trwałości podany na etykiecie zestawu. Po otwarciu woreczka z żelem krzemionkowym: 2–30°C, przez maksymalnie 28 dni.	Temperatura pokojowa.

Tabela 3. Podsumowanie dotyczące warunków transportu, przechowywania i użytkowania testu VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System i każdego jego składnika.

7. Środki ostrożności dla użytkowników

- Produkt jest przeznaczony do stosowania przez wykwalifikowany i przeszkolony personel laboratorium klinicznego, który został specjalnie poinstruowany i przeszkolony w zakresie metod Real-time PCR oraz procedur diagnostycznych *in vitro*.
- Do celów diagnostyki *in vitro*.
- Przed rozpoczęciem używania testu VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System należy dokładnie przeczytać instrukcję użytkowania produktu VIASURE oraz podręcznik użytkownika systemu BD MAX™ System. Nie należy wykonywać testu, dopóki nie zostaną zrozumiane informacje o procedurach, środkach ostrożności i ograniczeniach opisanych w tych dokumentach.
- Nie należy używać przeterminowanych odczynników i/lub materiałów.
- Nie używać zestawu, jeżeli etykieta zamykająca pudełko zewnętrzne została zerwana.
- Nie używać odczynników w razie otwarcia lub rozdarcia pudełka ochronnego w chwili dostarczenia.
- Nie używać odczynników w razie otwarcia lub rozdarcia woreczków ochronnych w chwili dostarczenia.
- Nie stosować odczynników, jeżeli środek osuszający nie jest obecny lub jest pęknięty wewnątrz woreczków odczynnika.

- Nie należy wyjmować środka osuszającego z woreczków z odczynnikami.
- Nie wolno używać odczynników, jeżeli folia została rozerwana lub uszkodzona.
- Nie wolno mieszać odczynników z różnych woreczków i (lub) zestawów i (lub) serii.
- Po każdym użyciu należy szybko zamknąć na zamek woreczki ochronne odczynników (aby chronić mieszaninę wzorcową przed światłem słonecznym). Przed zamknięciem woreczków należy usunąć z nich nadmiar powietrza.
- Chronić odczynniki przed wilgocią. Przedłużająca się ekspozycja na wilgoć może wpływać na skuteczność produktu.
- Aby uniknąć uszkodzenia etykiety, nie należy używać produktu w pobliżu rozpuszczalników.
- Na ogół występujący na spodzie próbówki inny od standardowego wygląd mieszaniny reakcyjnej w formie stabilnej (bez kształtu stożkowego, niejednorodny, mniejszy/większy i/lub w kolorze innym od białego) nie ma wpływu na funkcjonalność testu.
- Podczas ustawiania stojaka systemu BD MAX™ należy upewnić się, że próbówka reakcyjna i próbówka z buforem do rehydratacji zostały pewnie zatrzaśnięte w przewidzianym miejscu.
- W razie przeprowadzania innych testów PCR w tej samej części laboratorium należy zachować ostrożność, aby uniknąć skażenia testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, zestawu do ekstrakcji BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit lub jakichkolwiek dodatkowych odczynników potrzebnych do przeprowadzania testów oraz systemu BD MAX™ System. Przez cały czas należy unikać skażenia odczynników drobnoustrojami oraz rybonukleazą (RNaza) / dezoksyrybonukleazą (DNaza). Zaleca się stosowanie jałowych, wolnych od RNazy/DNazy, jednorazowych końcówek do pipet, przeciwaerozolowych, lub końcówek do pipet wyporowych. Do każdej próbki należy stosować nową końcówkę. Przed obchodzeniem się z odczynnikami i kartridżem trzeba zmieniać rękawiczki (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Aby uniknąć skażenia środowiska ampikonami, nie należy rozłamywać wkładu BD MAX™ PCR Cartridge po użyciu. Zamknięcia wkładu BD MAX™ PCR Cartridge mają na celu zapobieganie skażeniu.
- Należy zaplanować jednokierunkowy przepływ pracy. Przeprowadzanie testu należy zaczynać w miejscu wykonywania ekstrakcji, a następnie przechodzić do miejsca wykonywania amplifikacji i detekcji. Nie należy przenosić z powrotem próbek, sprzętu, i odczynników do miejsca, w którym wykonywano wcześniejszy etap testu.
- Należy postępować zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej. Należy stosować odzież ochronną, jednorazowe rękawiczki, okulary i maseczkę. W obszarze roboczym nie wolno jeść, pić, palić tytoniu ani nakładać środków kosmetycznych. Po zakończeniu przeprowadzania testu należy umyć ręce.
- Próbkę traktować jako potencjalnie zakaźną i/lub stanowiącą zagrożenie biologiczne, podobnie jak wszelkie odczynniki i materiały, które były narażone na kontakt z próbkami. Należy obchodzić się z nimi zgodnie z krajowymi przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa. Podczas pobierania, przechowywania, transportu, obsługi i utylizacji próbek należy zachowywać konieczne środki ostrożności.

- Próbkki i odczynniki należy obsługiwać w obrębie komory laminarnej. Należy stosować środki ochrony indywidualnej (ŚOI) zgodne z aktualnie obowiązującymi wytycznymi dotyczącymi obsługi potencjalnie zakaźnych próbek. Odpady należy usuwać zgodnie z odpowiednimi przepisami miejscowymi i krajowymi.
- Zaleca się regularne odkażanie często używanego sprzętu, szczególnie mikropipet i powierzchni roboczych.
- Zgodnie z Rozporządzeniem KE Nr 1907/2006 (REACH), testy VIASURE Assays for BD MAX™ System nie wymagają karty charakterystyki substancji niebezpiecznej, ponieważ na podstawie deklaracji zostały zakwalifikowane jako produkty bezpieczne dla zdrowia i środowiska, jako niezawierające substancji ani mieszanin spełniających kryteria klasyfikacji substancji niebezpiecznych dostępnych w dyrektywie KE Nr 1272/2008 (CLP) lub występujących w stężeniach przekraczających wartości ustalone w wymienionych przepisach. Oświadczenie stwierdzające brak wymogu dotyczącego karty charakterystyki substancji niebezpiecznej można uzyskać od firmy Certest Biotec S.L.
- Należy upewnić się, że definicja programu testu PCR w systemie BD MAX™ System została wykonana zgodnie z instrukcjami zawartymi w sekcji „Protokół PCR” (parametry ekstrakcji próbek, niestandardowe kody kreskowe, ustawienia PCR itp.).
- Dodatkowe ostrzeżenia, środki ostrożności i procedury opisano w instrukcji obsługi systemu BD MAX™ System.
- Certyfikat analizy nie jest dołączony do wyrobu, jednak w razie potrzeby można go pobrać z witryny internetowej firmy Certest Biotec S.L. (www.certest.es).

8. Procedura testowa

8.1. Pobieranie, transport i przechowywanie próbek

Test VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System został przebadany na wymazach ze zmian skórnych z okolic odbytu i narządów płciowych oraz jamy ustnej pobranych za pomocą wymazówki Copan ESwab® (wymazówka Copan's Liquid Amies Elution Swab) (dalej nazywanych naturalnymi próbkami zmian skórnych). Inne rodzaje próbek muszą zostać zweryfikowane przez użytkownika.

Pobieranie, transport i przechowywanie próbek powinno odbywać się w warunkach zatwierdzonych przez użytkownika. Zasadniczo próbki kliniczne należy pobierać i oznaczać w odpowiedni sposób w czystych pojemnikach z podłożem transportowym lub bez (w zależności od rodzaju próbki). Po pobraniu próbki należy umieścić w woreczku na materiały niebezpieczne, a następnie jak najszybciej przetransportować i poddać przetwarzaniu w celu zagwarantowania jakości wykonywanego testu. Transport próbek powinien odbywać się w temperaturze pokojowej lub w temperaturze $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$ przez maksymalnie 48 godzin, zgodnie z lokalnymi

i krajowymi przepisami dotyczącymi transportu materiałów chorobotwórczych. W przypadku transportu długoterminowego zalecamy przesyłanie w temperaturze -20°C lub niższej². Próbkę przesyłaną do testów molekularnych należy przechowywać w kontrolowanych warunkach, aby kwasy nukleinowe nie uległy degradacji podczas przechowywania. Zaleca się stosowanie świeżych próbek w teście, jednak w razie braku takiej możliwości lub w przypadku badania retrospektywnego próbki należy przechowywać najlepiej w temperaturze -70 albo -80°C lub ewentualnie w temperaturze -20°C ³.

Próbki kliniczne należy pobierać, transportować i przechowywać zgodnie z odpowiednimi wytycznymi laboratoryjnymi i/lub podręcznikami laboratoryjnymi. Można na przykład skorzystać z wytycznych IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... i 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 (Poradnik dotyczący wykorzystania laboratoriów mikrobiologicznych w rozpoznawaniu chorób zakaźnych: aktualizacja z 2018 roku wydana przez Stowarzyszenie Chorób Zakaźnych Ameryki oraz Amerykańskie Stowarzyszenie na rzecz Mikrobiologii). *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94), lub Sánchez-Romero, M. I., García-Lechuz Moya, J. M., González López, J. J. i Orta Mira, N. Collection, transport and general processing of clinical specimens in Microbiology laboratory. *Enfermedades Infecc. y Microbiol. Clin. (wyd. ang.)* 37, 127–134 (2019).

Prosimy pamiętać: Warunki pobierania, transportu i przechowywania próbek wskazane powyżej wyznaczono jako sugerowane na podstawie zaleceń dotyczących próbek pobranych z układu moczowo-płciowego, przeznaczonych do wykrywania kwasów nukleinowych, zgodnie ze wzmiankowanymi wcześniej wytycznymi. Zaleca się jednak stosowanie się do wytycznych laboratorium i/lub zapisów odpowiednich podręczników laboratoryjnych odnośnie do transportu i konserwacji próbek.

Wewnętrzne badanie stabilności próbek w przypadku testu VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System przeprowadzono z wykorzystaniem ujemnej naturalnej macierzy zmian skórnych z dodatkiem ludzkiego herpeswirusa typu 1, szczep KOS (ATCC® VR-1493, nr ref. FR-310 (IRR)), wirusa opryszczki pospolitej (Herpes simplex) typu 2, szczep MS (nr ref. 0810006CF, Zeptomatrix) i bakterii *Treponema pallidum*, szczep SS14 (Washington University) w stężeniu $3 \times \text{LoD}$. Stabilność analizowano za pomocą trzech różnych testów: testu stabilności próbki pierwotnej oraz stabilności w próbce SBT w temperaturze $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$ i $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, testu stabilności próbki pierwotnej w temperaturze $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ oraz testu z cyklami zamrażania (-80°C) i rozmrażania (25°C). Wyniki wykazały dobrą przydatność do dalszego

² Wytyczne IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... i 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 (Poradnik dotyczący wykorzystania laboratoriów mikrobiologicznych w rozpoznawaniu chorób zakaźnych: aktualizacja z 2018 roku wydana przez Stowarzyszenie Chorób Zakaźnych Ameryki oraz Amerykańskie Stowarzyszenie na rzecz Mikrobiologii). *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94))

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

wykorzystania próbek przechowywanych we wszystkich testowanych warunkach. Podsumowując, w odniesieniu do stabilności próbek pierwotnych naturalne próbki zmian skórnych są stabilne po 48 godzinach w temperaturze $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$ i $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. W odniesieniu do stabilności w próbówce SBT próbki są stabilne po 7 dniach w próbówce SBT w temperaturze $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$ i $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (po przechowywaniu przez maksymalnie 48 godzin w temperaturze $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$ i $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ przed dodaniem do próbówki SBT). Probki są ponadto stabilne po 6 miesiącach przechowywania w temperaturze $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ i przez co najmniej 5 cykli zamrażania i rozmrażania.

8.2. Przygotowanie próbki i ekstrakcja DNA

Dokonać przygotowania próbki zgodnie z zalecaniami podanymi w instrukcji użytkownika zastosowanego zestawu do ekstrakcji, BD MAX™ ExK™ TNA-3.

1. Pobrać pipetą 500 µl próbki do próbówki BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube i zamknąć próbówkę nasadką z podkładką. Zapewnić całkowite wymieszanie poprzez wytrząsanie próbki na wytrząsarce typu vortex z dużą prędkością przez 1 minutę. Przejść do BD MAX™ System Operation.

Uwaga: Upewnić się, że wytrząsanie próbki na wytrząsarce typu vortex zostało wykonane na kilka minut przed rozpoczęciem cyklu. Jeśli do ponownego badania używana jest ta sama próbówka BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube, zaleca się ręczne wstrząsanie próbówką przez kilka minut przed rozpoczęciem testu, aby zapewnić odpowiednią homogenizację próbki.

Należy pamiętać, że procedury przygotowania ekstrakcji właściwe dla danej aplikacji powinny zostać opracowane i zwalidowane przez użytkownika, a niektóre inne próbki mogą wymagać obróbki wstępnej.

8.3. Protokół PCR

Uwaga: Proszę zapoznać się ze szczegółowymi informacjami znajdującymi się w podręczniku dla użytkownika BD MAX™ System.

8.3.1. Tworzenie programu testu PCR dla testu VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System

Uwaga: Jeśli użytkownik utworzył już test dla testu VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, można pominąć punkt 8.3.1 i przejść bezpośrednio do punktu 8.3.2.

- 1) Na ekranie „Run” (Cykl) BD MAX™ System wybrać kartę „Test Editor” (Edytor testów).
- 2) Kliknąć przycisk „Create” (Utwórz).

Na karcie „Basic Information” (Podstawowe informacje):

- 3) Wpisać nazwę testu, np. VIASURE HHT, w polu „Test Name” (Nazwa testu).

Uwaga: Nazwa testu musi być unikalna i zawierać maksymalnie dwadzieścia znaków.

- 4) W rozwijanym menu „Extraction Type” (Typ ekstrakcji) wybrać „ExK TNA-3”.
- 5) W rozwijanym menu „Master Mix Format” (Format mieszaniny wzorcowej) wybrać „Type 5: Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer” (Typ 5: Stężona liofilizowana mieszanina wzorcowa z buforem rehydratacyjnym).
- 6) W polu „Sample Extraction Parameters” (Parametry ekstrakcji próbki) należy wybrać „User Defined” (Zdefiniowane przez użytkownika) i dostosować wartości parametrów (tabela 4).

<i>Sample Extraction Parameters</i> (Parametry ekstrakcji próbki)	Value (units) [Wartość (jednostki)]
<i>Lysis Heat Time</i> (Czas lizy termicznej)	15 (min)
<i>Lysis Temperature</i> (Temperatura lizy)	55 (°C)
<i>Sample Tip Height</i> (Wysokość zanurzenia końcówki pipety w próbce)	1600 (przesunięcia)
<i>Sample Volume</i> (Objętość próbki)	475 (µl)
<i>Wash Volume</i> (Objętość roztworu płuczącego)	500 (µl)
<i>Neutralization Volume</i> (Objętość bufora neutralizującego)	NIE DOTYCZY
<i>DNase Heat Time</i> (Czas podgrzewania Dnazy)	NIE DOTYCZY

Tabela 4. Parametry ekstrakcji próbki przeprowadzanej z użyciem BD MAX™ ExK™ TNA-3.

- 7) W polu „Ct Calculation” (Obliczenie Ct) wybrać „Call Ct at Threshold Crossing” (Wywołanie Ct przy przekroczeniu progu) – opcję domyślnie zaznaczoną.
- 8) W przypadku korzystania z oprogramowania w wersji 5.00 lub nowszej oraz używania oznaczonych kodem kreskowym probówek zamkniętych folią w polu „Custom Barcodes” (Niestandardowe kody kreskowe) należy wybrać następującą konfigurację:
 - a. Snap-In 2 Barcode (Kod kreskowy probówki 2): 1E (dotyczy *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* reaction tube).
 - b. Snap-In 3 Barcode (Kod kreskowy probówki 3): 11 (dotyczy probówki z buforem do rehydratacji Rehydration Buffer tube).

W karcie „PCR Settings” (Ustawienia PCR):

- 9) W polu „PCR Settings” (Ustawienia PCR) wpisać następujące parametry opisane w Tabeli 5: „Alias” (do siedmiu znaków alfanumerycznych), „PCR Gain” (Wzmocnienie PCR), „Threshold” (Próg), „Ct Min” i „Ct Max”.

Channel (Kanał)	Alias (Alias)	PCR Gain (Wzmocnienie PCR)	Threshold (Próg)	Ct Min (Ct Min.)	Ct Max (Ct Maks.)
475/520 (FAM)	HSV1	40	200	0	40
530/565 (HEX)	HSV2	60	200	0	40
585/630 (ROX)	EIC	40	200	0	40
630/665 (Cy5)	TRE	60	200	0	40
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabela 5. Ustawienia PCR.

Uwaga: Zaleca się ustawianie jako punktu startowego dla każdego kanału minimalnych wartości progowych podanych powyżej, ale ostateczne ustawienia musi ustalić użytkownik końcowy w trakcie interpretacji wyników w celu upewnienia się, że wartości progowe przypadają w obrębie fazy eksponencjalnej krzywych fluorescencji i powyżej wszelkich sygnałów tła. Wartość progowa dla różnych przyrządów może się różnić ze względu na różne intensywności sygnału.

10) W polu „Color compensation” (Kompensacja koloru) wpisać poniższe parametry (Tabela 6).

		False Receiving Channel (Fałszywy kanał odbiorczy)				
Channel (Kanał)		475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Kanał pobudzenia)	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	-

Tabela 6. Parametry „Color compensation” (Kompensacja koloru).

W karcie „Melt Settings” (Ustawienia topnienia) nie trzeba wykonywać żadnych czynności, ponieważ nie ma ona zastosowania w przypadku tego produktu.

Na karcie „Test Steps” (Etapy testu):

11) Wpisać nazwę etapu (do dwudziestu znaków) i ustawić następujące parametry, aby zdefiniować każdy etap protokołu PCR: „Profile Type” (Typ profilu), „Cycles” (Cykle), „Time” (Czas) i „Temperature” (Temperatura), a następnie w polu „Detect” (Wykrywanie) zdefiniować etap wykrywania (Tabela 7). Kliknąć przycisk „Add” (Dodaj), aby dodać nowy etap i powtarzać czynność, aż do zdefiniowania wszystkich potrzebnych etapów.

Uwaga: Pole „Type” (Rodzaj) musi być puste.

Step (Etap)	Step name (Nazwa etapu)	Profile Type (Rodzaj profilu)	Cycles (Cykle)	Time (s) [Czas (s)]	Temperature (Temperatura)	Detect (Wykrywanie)
Wstępna denaturacja	IN-denaturation	Hold	1	120	98°C	-
Denaturacja i hybrydyzacja/wydłużanie (gromadzenie danych)	Annealing/Extension	2-Temperature	45	10	95°C	-
				41	63°C	✓

Tabela 7. Protokół PCR.

Na karcie „Result Logic” (Logika wyniku):

12) W polu „Target” (Wykrywany element) wpisać nazwę wykrywanego elementu, np. HSV-1 (do siedmiu znaków alfanumerycznych). Powtórzyć czynności 12–15 w przypadku każdego

wykrywanego elementu (tj. HSV-2 lub TRE), postępując zgodnie z tabelami właściwymi dla zdefiniowanego wykrywanego elementu.

- 13) Kliknąć pole wyboru „Analize” (Analizuj), aby uwzględnić pożądane długości fali (kanały PCR) w analizie wyniku dotyczącego wykrywanego elementu (Tabele 8–10).

<i>Wavelength</i> (Długość fali)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Typ)	<i>Analize</i> (Analizuj)
475/520	HSV1	PCR	✓
585/630	EIC	PCR	✓

Tabela 8. Wybór kanałów PCR na karcie „Result logic” (Wynik logiczny) w odniesieniu do wykrywanego elementu w postaci wirusa HSV-1 (wirus opryszczki pospolitej (Herpes simplex) typu 1).

<i>Wavelength</i> (Długość fali)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Typ)	<i>Analize</i> (Analizuj)
530/565	HSV2	PCR	✓
585/630	EIC	PCR	✓

Tabela 9. Wybór kanałów PCR na karcie „Result logic” (Wynik logiczny) w odniesieniu do wykrywanego elementu w postaci wirusa HSV-2 (wirus opryszczki pospolitej (Herpes simplex) typu 2).

<i>Wavelength</i> (Długość fali)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Typ)	<i>Analize</i> (Analizuj)
585/630	EIC	PCR	✓
630/665	TRE	PCR	✓

Tabela 10. Wybór kanałów PCR na karcie „Result logic” (Wynik logiczny) w odniesieniu do wykrywanego elementu w postaci bakterii TRE (*Treponema pallidum*).

- 14) Kliknąć przycisk „Edit Logic” (Edytuj logikę).

- 15) W oknie „Edit Logic” (Edytuj logikę) wyświetlane są wszystkie kombinacje typów wyników. Wybrać zgodnie z tabelami 11–13 w przypadku każdego wiersza z menu rozwijanego „Result” (Wynik) wynik, który jest wywoływany po spełnieniu warunków z danego wiersza.

<i>Result</i> (Wynik)	HSV-1 (475/520)	EIC (585/630)
POS	Valid (Ważna)	Valid (Ważna)
UNR	Valid (Ważna)	Invalid (Nieważna)
NEG	Invalid (Nieważna)	Valid (Ważna)
UNR	Invalid (Nieważna)	Invalid (Nieważna)

Tabela 11. Lista kombinacji typów wyników i logiki wyników w przypadku wykrywanego elementu w postaci wirusa HSV-1 (wirus opryszczki pospolitej (Herpes simplex) typu 1). Dostępne wyniki to POS (dodatni), NEG (ujemny) i UNR (nierozstrzygający).

<i>Result</i> (Wynik)	HSV-2 (530/565)	EIC (585/630)
POS	Ważna	Ważna
UNR	Ważna	Nieważna
NEG	Nieważna	Ważna
UNR	Nieważna	Nieważna

Tabela 12. Lista kombinacji typów wyników i logiki wyników w przypadku wykrywanego elementu w postaci wirusa HSV-2 (wirus opryszczki pospolitej (Herpes simplex) typu 2). Dostępne wyniki to POS (dodatni), NEG (ujemny) i UNR (nierozstrzygający).

<i>Result</i> (Wynik)	TRE (630/665)	EIC (585/630)
POS	Ważna	Ważna
UNR	Ważna	Nieważna
NEG	Nieważna	Ważna
UNR	Nieważna	Nieważna

Tabela 13. Lista kombinacji typów wyników i logiki wyniku w przypadku wykrywanego elementu w postaci bakterii TRE (*Treponema pallidum*). Dostępne wyniki to POS (dodatni), NEG (ujemny) i UNR (nierozstrzygający).

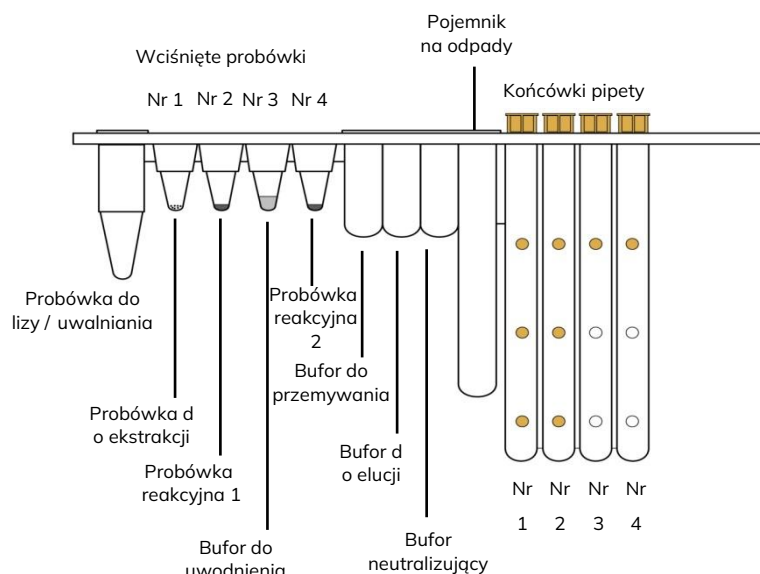
Uwaga: Zgodnie z wcześniej zdefiniowaną wartością Ct Maks. (tabela 5) typ wyniku w przypadku kanałów HSV-1 (475/520), HSV-2 (530/565), EIC (585/630) i TRE (630/665) jest uznawany za „Valid” (ważny), gdy uzyskana wartość Ct wynosi ≤ 40 , oraz „Invalid” (nieważny), gdy uzyskana wartość Ct wynosi > 40 .

16) Aby zapisać test, należy kliknąć przycisk „Save” (Zapisz).

8.3.2. Ustawienie statywu BD MAX™

- 1) Dla każdej próbki, która ma być poddana testowi, wyjąć jeden Unitized Reagent Strip (indywidualny pasek odczynnikowy) z zestawu BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Delikatnie stuknąć każdym paskiem o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że wszystkie płyny znajdują się na dnie probówek i załadować na statyw na próbki systemu BD MAX™ System.
- 2) Wyjąć potrzebną liczbę probówek do ekstrakcji BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (biała folia) z saszetki ochronnej. Wcisnąć probówkę (probówki) do ekstrakcji w odpowiadające jej (im) miejsca w pasku TNA (Pozycja 1, biały kolor kodu na statywie. Zob. Rys. 1). Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczek na zamek.
- 3) Określić i oddzielić odpowiednią liczbę *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* reaction tubes (folia 1E) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca na pasku (pozycja 2, zielony kolor kodu na statywie. Zob. Rys. 1).
 - a. Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczki aluminiowe na zamek.
 - b. Aby prawidłowo przeprowadzić rehydratację, należy upewnić się, że liofilizowany produkt znajduje się na spodzie probówki i nie przylega do górnej powierzchni probówki ani do foliowego zamknięcia. Delikatnie stuknąć każdą probówką o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że produkt znajduje się na spodzie probówki.
- 4) Wyjąć potrzebną liczbę probówek Rehydration Buffer tubes (folia 11) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca na pasku (Pozycja 3, bez oznaczenia kolorem na statywie. Zob. Rys. 1).
 - a. Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczek na zamek.
 - b. Aby zapewnić prawidłowy transfer, należy upewnić się, że płyn znajduje się na spodzie probówki i nie przylega do górnej powierzchni probówki ani do foliowego zamknięcia. Delikatnie stuknąć każdą probówką o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że bufor znajduje się na spodzie probówki.

Rysunek 1. Pasek odczynnikowy BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) z zestawu BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



8.3.3. Konfiguracja instrumentu BD MAX™

- 1) Wybrać kartę „Worklist” (Lista robocza) na ekranie „Run” (Cykl) oprogramowania BD MAX™ System w wersji 4.50A lub wyższej.
- 2) W rozwijanym menu „Test” wybrać żądany test, tj. VIASURE HHT (jeśli jeszcze nie utworzono, patrz punkt 8.3.1).
- 3) W rozwijanym menu „Kit Lot Number” (Numer partii zestawu) wybrać odpowiedni numer partii zestawu (znajdujący się na zewnętrznym pudełku używanego zestawu do ekstrakcji) (opcjonalnie).
Uwaga: Numery partii należy zdefiniować w wyświetlanym menu „Inventory” (Inwentarz), zanim będzie możliwe ich wybrania w tym miejscu.
- 4) W polu „Sample tube” (Probówka z próbką) uzupełnić numer identyfikacyjny Sample Buffer Tube (probówki z buforem próbki), skanując kod paskowy skanerem lub wpisując go ręcznie.
- 5) Wypełnić pole „Patient ID” (Identyfikator pacjenta) i/lub „Accession” (Numer dostępu) i kliknąć klawisza Tab (Tabulator) lub Enter. Kontynuować, aż zostaną wprowadzone kody paskowe wszystkich probówek Sample Buffer Tubes (probówek z buforem próbki). Upewnić się, że „specimen/patient ID” (identyfikator próbki lub pacjenta) oraz „Sample Buffer Tubes” (probówki z buforem próbki) zostały dokładnie dopasowane.
- 6) Umieścić przygotowaną Sample Buffer Tube (próbówkę z buforem próbki) w statywie (statywach) BD MAX™ Rack(s).
- 7) Załadować statyw (statywy) do BD MAX™ System (statyw A po lewej stronie systemu BD MAX™ System, a statyw B – po prawej).
- 8) Włożyć potrzebną liczbę kartridży BD MAX™ PCR Cartridge(s) do systemu BD MAX™ System.
- 9) Zamknąć drzwiczki systemu BD MAX™ System.

10) Kliknąć „Start” (Rozpocznij cykl), aby rozpocząć procedurę.

8.3.4. Raport wyników z BD MAX™ System

- 1) Na pasku menu kliknąć przycisk „Results” (Wyniki).
- 2) Kliknąć dwukrotnie wybrany cykl na liście lub nacisnąć przycisk „View” (Wyświetl).
- 3) Przyciski „Print” (Drukuj) i „Export” (Eksportuj) u dołu ekranu zostaną odblokowane.

Aby wydrukować wyniki:

1. Należy kliknąć przycisk „Print” (Drukuj).
2. W oknie podglądu „Print” (Drukuj) raportu z cyklu wybrać: „Run Details”, „Test Details” i „Plots” (Szczegóły Cyklu, Szczegóły Testu i Wykresy).
3. Kliknąć „Print” (Drukuj), aby wydrukować raport lub „Export” (Eksportuj), aby wyeksportować raport w formacie PDF do pliku na nośniku USB.

Aby wyeksportować wyniki:

1. Należy kliknąć przycisk „Export” (Eksportuj), aby przenieść raport (plik PDF i CSV) na nośnik USB.
2. Po zakończeniu eksportu, w oknie „Results Export” (Eksport wyników) pojawi się ikona informująca o powodzeniu lub niepowodzeniu eksportu.

9. Interpretacja wyników

Szczegółowe informacje na temat analizowania danych podano w Podręczniku Użytkownika systemu BD MAX™ System.

Analiza danych jest przeprowadzana przez oprogramowanie BD MAX™ zgodnie z instrukcjami producenta. Oprogramowanie BD MAX™ zgłasza wartości Ct i krzywe amplifikacji dla każdego kanału detektora dla każdej badanej próbki w następujący sposób:

- wartość Ct wynosząca 0 wskazuje, że nie została przez oprogramowanie obliczona wartość Ct przy określonym progu (patrz Tabela 5). Krzywą amplifikacji dla próbki wykazującej wartość Ct „0” należy sprawdzić ręcznie.
- Wartość Ct wynosząca -1 wskazuje, że nie nastąpił proces amplifikacji, że oprogramowanie nie obliczyło żadnej wartości Ct lub że obliczona wartość Ct jest niższa od określonego progu lub wyższa od ustalonej wartości Ct Maks. (wartość odcięcia).
- Każdą inną wartość Ct należy zinterpretować w powiązaniu z krzywą amplifikacji i zgodnie ze zdefiniowaną logiką wyników, postępując według wytycznych interpretacji próbki streszczonych w Tabeli 14.

Należy sprawdzić sygnał endogennej kontroli wewnętrznej (EIC), aby zweryfikować, czy mieszanina do amplifikacji działa prawidłowo. Dodatkowo należy sprawdzić, czy nie ma raportu o awarii systemu BD MAX™ System.

Wyniki należy odczytywać i analizować za pomocą poniższej tabeli:

HSV-1 (nazwa wykrywanego elementu: HSV1)	HSV-2 (nazwa wykrywanego elementu: HSV2)	<i>T. pallidum</i> (nazwa wykrywanego elementu: TRE)	Interpretacja indywidualnych próbek pacjenta
POS	POS	POS	Wykryto DNA wirusa HSV-1, wirusa HSV-2 i bakterii <i>Treponema pallidum</i> .
POS	POS	NEG	Wykryto DNA wirusa HSV-1 i wirusa HSV-2. Nie wykryto DNA bakterii <i>Treponema pallidum</i> .
POS	NEG	POS	Wykryto DNA wirusa HSV-1 i bakterii <i>Treponema pallidum</i> . Nie wykryto DNA wirusa HSV-2.
NEG	POS	POS	Wykryto DNA wirusa HSV-2 i bakterii <i>Treponema pallidum</i> . Nie wykryto DNA wirusa HSV-1.
POS	NEG	NEG	Wykryto DNA wirusa HSV-1. Nie wykryto DNA wirusa HSV-2 ani bakterii <i>Treponema pallidum</i> .
NEG	POS	NEG	Wykryto DNA wirusa HSV-2. Nie wykryto DNA wirusa HSV-1 ani bakterii <i>Treponema pallidum</i> .
NEG	NEG	POS	Wykryto DNA bakterii <i>Treponema pallidum</i> . Nie wykryto DNA wirusa HSV-1 ani wirusa HSV-2.
NEG	NEG	NEG	Nie wykryto DNA wirusa HSV-1, wirusa HSV-2 ani bakterii <i>Treponema pallidum</i> .
UNR	UNR	UNR	Wynik nierozstrzygający (UNR, ang. Unresolved) uzyskany w obecności inhibitorów w reakcji PCR lub w razie wystąpienia ogólnego problemu (niezgłaszanego według kodu błędu) w trakcie przetwarzania próbki i/lub etapu amplifikacji ¹ .
IND	IND	IND	Wynik testu nieokreślony (IND, ang. Indeterminate). Z powodu awarii systemu BD MAX™ System. Wynik testu wyświetlany w przypadku awarii urządzenia powiązanej z kodem błędu ² .
INC	INC	INC	Niepełny wynik testu (INC, ang. Incomplete). Z powodu awarii systemu BD MAX™ System. Wynik testu wyświetlany w przypadku nieprzeprowadzenia pełnego cyklu oznaczeń ² .

Tabela 14. Interpretacja próbki.

1 Endogenna kontrola wewnętrzna (EIC) musi wykazywać sygnał amplifikacji z wartością Ct ≤40, aby można było ją uwzględnić. W przypadku braku sygnału kontroli EIC lub wartości Ct >40 wynik jest uznawany za nierozstrzygający (UNR) i wymagane jest powtórzenie testu. Zaleca się powtórzenie testu z użyciem tej samej próbki Sample Buffer Tube (SBT), tej samej próbki po umieszczeniu jej w nowej probówce SBT lub nowej próbki (o wyższym stężeniu, o ile to możliwe). Wynik nierozstrzygający (UNR) można także uzyskać ze względu na obecność substancji hamujących reakcję PCR. W takich przypadkach zaleca się rozcieńczenie próbek w stosunku 1/10.

UWAGA: naturalne próbki zmian skórnych można przechowywać bez przenoszenia do próbki SBT przez maksymalnie 48 godzin, jeśli są przechowywane w temperaturze 2 ±2°C – 25 ±2°C (w wymazówce ESwab® firmy Copan). W przypadku powtórzenia testu z użyciem materiału z tej samej próbki SBT zaleca się ręczne wstrząśnięcie probówką SBT, aby zapewnić odpowiednią homogenizację próbki. Należy pamiętać, że naturalne próbki zmian skórnych można przechowywać w probówce SBT przez maksymalnie 7 dni w temperaturze 2 ±2°C – 25 ±2°C.

2 Wyniki nieokreślone (IND) lub niepełne (INC) można uzyskać ze względu na awarię systemu i konieczne jest wówczas powtórzenie testu. Interpretację kodów ostrzeżeń i błędów można znaleźć w podręczniku użytkownika systemu BD MAX™ System.

Uwaga: Przy stosowaniu kontroli zewnętrznych należy spodziewać się następujących wyników: ujemnych dla ENC i dodatnich dla EPC (znane dodatnie próbki są oczekiwane jako dodatnie tylko dla mikroorganizmów obecnych w próbce). ENC, która daje dodatni wynik testu, wskazuje na zdarzenie skażenia lub nieprawidłowe postępowanie z próbką. EPC, która daje ujemny wynik testu, wskazuje na problem z postępowaniem/przygotowaniem próbki. Należy przeanalizować technikę obsługi/przygotowania próbki. W przypadku niepowodzenia kontroli zewnętrznej należy powtórzyć test.

W przypadku dalszego uzyskiwania niejednoznacznego wyniku, zalecane jest ponowne zapoznanie się z instrukcją użytkowania i przeanalizowanie stosowanego przez użytkownika procesu izolacji w celu zweryfikowania prawidłowości wykonywania każdego etapu PCR oraz sprawdzenia parametrów. Należy również sprawdzić, czy uzyskano esowaty kształt krzywej oraz natężenie fluorescencji.

Wyniki testu powinien oceniać członek fachowego personelu medycznego w kontekście wywiadu medycznego, klinicznych objawów przedmiotowych, oraz innych testów diagnostycznych.

10. Ograniczenia testu

- Wyniki testu powinien oceniać członek fachowego personelu medycznego w kontekście wywiadu medycznego, klinicznych objawów przedmiotowych, oraz innych testów diagnostycznych.
- Chociaż ten test można stosować przy innych rodzajach próbek, zweryfikowano go wyłącznie w odniesieniu do wymazów ze zmian skórnych z okolic odbytu i narządów płciowych oraz jamy ustnej.
- Aby zapewnić dobrą wydajność testu, liofilizowany produkt powinien znajdować się na spodzie próbki, a nie przylegać do górnej powierzchni próbki ani do foliowego zamknięcia. Delikatnie stuknąć każdą próbką o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że produkt znajduje się na spodzie próbki.
- Jeśli nie ma elementu do wykrycia, w pustych kanałach BD MAX™ System może wystąpić zjawisko sygnału krzyżowego (cross-talk), dlatego podczas interpretacji wyników należy wybierać tylko te kanały, w których odbywa się amplifikacja. W przypadku wszelkich pytań należy kontaktować się z viasuresupport@certest.es.
- Jakość testu zależy od jakości próbki; konieczna jest prawidłowa ekstrakcja z próbek klinicznych.
- Jest to test jakościowy i nie zapewnia on wartości ilościowych ani nie wskazuje liczby obecnych drobnoustrojów. Nie jest możliwe skorelowanie wartości Ct uzyskanych metodą PCR ze stężeniem próbki, ponieważ zależą one od użytego termocyklera i samego cyklu.
- Możliwe jest wykrycie niezwykle niskich poziomów sekwencji docelowych poniżej granicy wykrywania, ale wyniki mogą nie być powtarzalne.

- Należy zwrócić uwagę na zamierzony zakres pomiarowy testu, ponieważ próbki o stężeniach powyżej lub poniżej tego zakresu mogą dawać błędne wyniki.
- Istnieje możliwość uzyskania fałszywie dodatnich wyników z powodu skażenia krzyżowego przez wirusa HSV-1, wirusa HSV-2 i/lub bakterii *T. pallidum* próbki zawierające wysokie stężenia docelowego DNA lub skażenia spowodowanego produktami PCR z poprzednich reakcji.
- Stosowane w teście VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System kombinacje swoistych primerów i sond do wykrywania genu *UL1 kodującego glikoproteinę L* w przypadku wirusa HSV-1, genu *US4 kodującego glikoproteinę G* w przypadku wirusa HSV-2 i genu *16S rRNA* bakterii *T. pallidum* nie wykazują istotnych złożonych homologii z ludzkim genomem, ludzką mikroflorą ani innymi mikroorganizmami, co mogłoby prowadzić do przewidywalnych wyników fałszywie dodatnich.
- Wyniki fałszywie ujemne mogą być skutkiem kilku czynników i ich kombinacji, w tym:
 - nieprawidłowego pobierania, transportu, przechowywania i/lub metod obsługi próbek,
 - nieprawidłowych procedur przetwarzania (w tym ekstrakcji DNA),
 - uleganiu degradacji DNA podczas transportu/przechowywania i/lub przetwarzania próbki.
 - mutacji lub polimorfizmów w regionach wiązania primera lub sondy, które mogą wpływać na wykrywanie nowych lub nieznanych szczepów wirusa HSV-1, wirusa HSV-2 i/lub bakterii *T. pallidum*,
 - miana drobnoustrojów w próbce poniżej granicy wykrywania testu,
 - obecności inhibitorów reakcji qPCR albo innych typów substancji interferujących. Nie oceniano wpływu szczepionek, niektórych leków przeciwwirusowych, antybiotyków, chemioterapeutyków czy immunosupresantów, ani leków przeciwwgrzybiczych stosowanych w celu zapobiegania zakażeniu lub stosowanych w trakcie leczenia zakażenia.
 - Wpływ substancji zakłócających został oceniony wyłącznie w przypadku tych wskazanych w punkcie 12.5.1 („Badanie substancji zakłócających”) niniejszej instrukcji użytkowania. Prosimy o zapoznanie się z tym rozdziałem w celu sprawdzenia najczęstszych substancji endogennych i egzogennych, które indukują całkowite lub częściowe zakłócenie reakcji qPCR. Inne substancje nie wymienione w tej części mogą prowadzić do błędnych wyników.
 - nieprzestrzegania instrukcji użytkowania i procedury przeprowadzania testu.
- Wynik dodatni testu nie musi koniecznie oznaczać obecności żywych mikroorganizmów i nie sugeruje, że te mikroorganizmy są zakaźne czy też są przyczyną objawów klinicznych. Jednakże wynik dodatni wskazuje na obecność sekwencji docelowych wirusa HSV-1, wirusa HSV-2 i/lub bakterii *T. pallidum*.
- Wyniki ujemne nie wykluczają obecności w próbce klinicznej DNA wirusa HSV-1, wirusa HSV-2 i/lub bakterii *T. pallidum* i nie należy ich używać jako jedynej podstawy podejmowania decyzji dotyczących leczenia lub innego postępowania z pacjentem. Nie określono optymalnych rodzajów próbek ani czasu występowania maksymalnych stężeń drobnoustrojów w trakcie zakażeń wywoływanych przez wirus

HSV-1, wirus HSV-2 i/lub bakterię *T. pallidum*. Do wykrycia czynnika patogennego może być konieczne pobranie wielu próbek (różne rodzaje i punkty czasowe) od tego samego pacjenta.

- Jeśli badania diagnostyczne pod kątem innych chorób przenoszonych drogą płciową są ujemne, a obserwacje kliniczne, wywiad pacjenta i informacje epidemiologiczne sugerują możliwość zakażenia wirusem HSV-1, wirusem HSV-2 i/lub bakterią *T. pallidum*, wówczas należy wziąć pod uwagę możliwość wyniku fałszywie ujemnego i rozważyć ponowne wykonanie badania u pacjenta.
- Wartości fluorescencji mogą się różnić z powodu wielu czynników, takich jak: sprzęt do PCR (nawet ten sam model), system ekstrakcji, rodzaj próbki, poprzednie przetwarzanie próbki itp.
- Wartości predykcyjne dodatnie i ujemne są wysoce zależne od częstości występowania we wszystkich testach diagnostycznych *in vitro*. Skuteczność działania testu VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System może się różnić w zależności od częstości występowania zakażeń i populacji, u której wykonuje się test.
- W przypadku uzyskania wyników nierozstrzygujących, nieokreślonych lub niepełnych przy użyciu testu VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System wymagane będzie powtórzenie testu. Wyniki nierozstrzygujące mogą być skutkiem obecności inhibitorów w próbce lub niewłaściwej rehydratacji w próbówce z liofilizowaną mieszaniną reakcyjną. W razie awarii urządzenia uzyskuje się wyniki nieokreślone lub niepełne.

11. Kontrola jakości

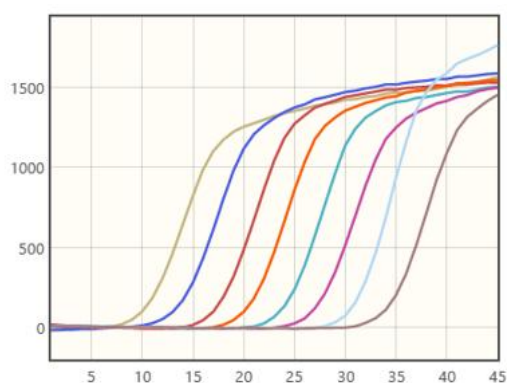
Test VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System zawiera endogenną kontrolę wewnętrzną (EIC) w każdej próbówce reakcyjnej, co potwierdza prawidłowe wykonanie stosowanej techniki. Ponadto zastosowanie kontroli zewnętrznych (EPC i ENC) umożliwia potwierdzenie skuteczności działania testu. Kontrole zewnętrzne nie są wykorzystywane przez system BD MAX™ System do interpretacji wyników, lecz są traktowane jako próbka. Zewnętrzna kontrola dodatnia (EPC) służy do monitorowania ewentualnej awarii odczynników testowych, natomiast zewnętrzna kontrola ujemna (ENC) służy do wykrywania skażenia środowiska lub odczynników przez docelowe kwasy nukleinowe.

12. Charakterystyki skuteczności analitycznej

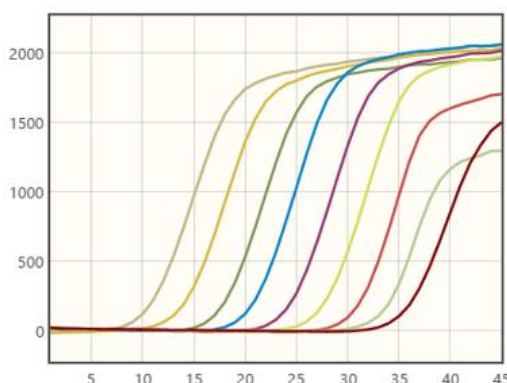
12.1. Liniowość analityczna

Liniowość testu została określona i potwierdzona poprzez testowanie serii dziesięciokrotnych rozcieńczeń sztucznej macierzy zmian skórnych⁴ (Artificial Matrix for Cutaneous Lesion, Biochemazone BZ394) zawierającej znane stężenie (w zakresie od $2E+07$ do $2E+01$ kopii/ μ l) swoistego i syntetycznego DNA wirusa HSV-1, wirusa HSV-2 i bakterii *T. pallidum*. Poniżej przedstawiono przykład wykresu amplifikacji uzyskanego z użyciem testu.

Rysunek 2. Rozcieńczenia seryjne w przypadku cyklu wzorca wirusa HSV-1 (od $2E+07$ do $2E+01$ kopii/ μ l) w systemie BD MAX™ System (kanał 475/520 (FAM)).

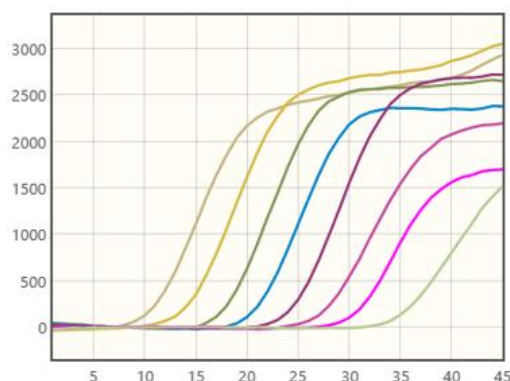


Rysunek 3. Rozcieńczenia seryjne w przypadku cyklu wzorca wirusa HSV-2 (od $2E+07$ do $2E+01$ kopii/ μ l) w systemie BD MAX™ System (kanał 530/565 (HEX)).



⁴ Ze względu na ograniczoną dostępność wymazów ze zmian skórnych z okolic odbytu i narządów płciowych oraz jamy ustnej przeprowadzono badanie równoważności naturalnej macierzy w porównaniu z macierzą sztuczną, aby potwierdzić możliwość stosowania sztucznej macierzy w testach walidacyjnych. W związku z tym zarówno naturalne, jak i sztuczne macierze zostały przetestowane i potwierdzone jako równoważne.

Rysunek 4. Rozcieńczenia seryjne w przypadku cyklu wzorca bakterii *T. pallidum* (od $2E+07$ do $2E+01$ kopii/ μ l) w systemie BD MAX™ System (kanał 630/665 (Cy5)).



12.2. Czułość analityczna

Czułość analityczna jest często nazywana granicą wykrywalności (LoD). W praktyce parametry LoD i granicy wartości tła (LoB) są określane w ramach oceny czułości analitycznej.

12.2.1. Granica wartości tła (LoB)

Aby określić „granicę wartości tła” (LoB), przeprowadzono test kontrolny bez wzorca, przy użyciu trzech partii testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, i 24 replikatów trzech rodzajów próbek: ujemnych naturalnych próbek zmian skórnych, sztucznej macierzy zmian skórnych i wody bez zawartości RNAzy/DNAzy.

Zweryfikowano brak obecności sygnału w kanałach FAM, HEX i Cy5, a także obecność sygnału w przypadku endogennej kontroli wewnętrznej (EIC) w kanale ROX w odniesieniu do ujemnej macierzy (naturalnej lub symulowanej macierzy zmian skórnych). Podsumowując, uzyskane wyniki potwierdziły, że produkt nie generuje nieswoistych amplifikacji w przypadku różnych testowanych macierzy.

12.2.2. Granica wykrywalności (LoD)

Granica wykrywalności (LoD) testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System została przeanalizowana z wykorzystaniem trzech partii naturalnych próbek zmian skórnych. Użyto następujących szczepów referencyjnych: ludzki herpeswirus typu 1, szczep KOS (ATCC® VR-1493, nr ref. FR-310 (IRR)), wirus opryszczki pospolitej (Herpes simplex) typu 2, szczep MS (nr ref. 0810006CF, Zeptomatrix) i bakteria *Treponema pallidum*, szczep SS14 (University of Washington). Podsumowując, test VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System wykazał w przypadku naturalnych próbek zmian skórnych LoD na poziomie $2,52E+02$ TCID₅₀/ml w przypadku wirusa HSV-1, $6,30E+00$ TCID₅₀/ml w przypadku wirusa HSV-2 i $6,60E+03$ komórek/ml w przypadku bakterii *T. pallidum*, z odsetkiem wyników dodatnich $\geq 95\%$.

12.3. Zakres pomiarowy

Zakres pomiarowy testu określono, testując serię *dziesięciokrotnych rozcieńczeń zawierających znane stężenie swoistego DNA* wirusa HSV-1, wirusa HSV-2 i bakterii *T. pallidum*. Wyniki pozwoliły potwierdzić prawidłową detekcję sekwencji docelowych w zakresie od 2E+07 do 2E+00 kopii/μl w przypadku wykrywania wirusa HSV-1 i bakterii *T. pallidum* oraz w zakresie od 2E+07 do 2E-01 kopii/μl w przypadku wykrywania wirusa HSV-2.

Podsumowując, zakres pomiarowy testu VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System został pomyślnie określony, zapewniając uzyskiwanie rzetelnych, dokładnych i powtarzalnych wyników w szerokich zakresach wirerii/bakteriemii, co potwierdza jego przydatność w różnych scenariuszach diagnostyki klinicznej.

12.4. Dokładność

12.4.1. Prawdziwość

Prawdziwość wyników uzyskiwanych przy użyciu testu VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System oceniano w testach wymienionych poniżej materiałów referencyjnych po ich dodaniu do macierzy zmian skórnych.

1. Fragmenty syntetycznego DNA

- Syntetyczny fragment DNA genu *UL1 kodującego glikoproteinę L* w przypadku wirusa HSV-1: HSV1.XPC, kanał FAM.
- Syntetyczny fragment DNA genu *US4 kodującego glikoproteinę G* w przypadku wirusa HSV-2: HSV2.XPC, kanał HEX.
- Syntetyczny fragment DNA w przypadku genu *16S rRNA* bakterii *T. pallidum*: TREXPC, kanał Cy5.

Wszystkie fragmenty syntetycznego DNA zostały wykryte prawidłowo w odpowiednim kanale.

2. American Type Culture Collection (ATCC®)

Referencja zewnętrzna	Mikroorganizm	Nazwa produktu	Odmiana	Wynik
VR-1493	Wirus opryszczki pospolitej typu 1	Human herpesvirus 1	Szczep KOS	Wykryty
VR-260	Wirus opryszczki pospolitej typu 1	Human Herpesvirus 1	Szczep HF	Wykryty
VR-539	Wirus opryszczki pospolitej typu 1	Human Herpesvirus 1	Szczep MacIntyre	Wykryty
VR-733	Wirus opryszczki pospolitej typu 1	Human Herpesvirus 1	Szczep F	Wykryty
VR-3393	Wirus opryszczki pospolitej typu 2	Human Herpesvirus 2	Szczep G	Wykryty

VR-1779	Wirus opryszczki pospolitej typu 2	Human Herpesvirus 2	Szczep ATCC-2011-2	Wykryty
BAA-2642SD	<i>Treponema pallidum</i>	Quantitative Synthetic <i>Treponema pallidum</i> DNA	NIE DOTYCZY	Nie wykryto

Tabela 15. Materiał referencyjny z American Type Culture Collection (ATCC®).

Wszystkie szczepy z ATCC zostały prawidłowo wykryte w odpowiednim kanale, a EIC wykazała amplifikację o wartości $Ct \leq 40$; nie dotyczyło to wyłącznie syntetycznego DNA bakterii *Treponema pallidum* do badań ilościowych (kod ATCC BAA-2642SD). To syntetyczne DNA obejmuje fragmenty genu *polA*, genu *23S*, genu *16S*, *flaA*, genu białka *47kDa* i *bmp*, jednak brak wykrycia przez test VIASURE Assay przy bardzo wysokim stężeniu (do $4,70E+04$ kopii/ μ l) sugeruje, że w syntetycznym DNA z ATCC obszar wykrywanego elementu nie jest uwzględniony w genie *16S*. W związku z tym nie można go używać jako materiału referencyjnego.

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

Referencja zewnętrzna	Mikroorganizm	Nazwa produktu	Odmiana	Wynik
16/368	Wirus opryszczki pospolitej typu 1	1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-1 (HSV-1)	NIE DOTYCZY	Wykryty
17/122	Wirus opryszczki pospolitej typu 2	1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-2 (HSV-2)	NIE DOTYCZY	Wykryty

Tabela 16. Materiał referencyjny National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC).

Wszystkie szczepy z NIBSC zostały prawidłowo wykryte w odpowiednim kanale, a EIC wykazała amplifikację o wartości $Ct \leq 40$.

4. Materiał kontrolny

Referencja zewnętrzna	Pochodzenie	Mikroorganizm	Nazwa produktu	Odmiana	Wynik
0810006CF	ZeptoMetrix	Wirus opryszczki pospolitej typu 2	Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2)	Szczep MS	Wykryty
MBC109	Viricell S.L.	<i>Treponema pallidum</i>	AMPLIRUN® TREPONEMA PALLIDUM DNA CONTROL	NIE DOTYCZY	Wykryty
NIE DOTYCZY	University of Washington	<i>Treponema pallidum</i>	Heat-killed <i>Treponema pallidum</i>	Szczep Nichols	Wykryty
NIE DOTYCZY	University of Washington	<i>Treponema pallidum</i>	Heat-killed <i>Treponema pallidum</i>	Szczep SS14	Wykryty

Tabela 17. Materiał kontrolny dla wirusa HSV-2 i bakterii *T. pallidum* z Viricell S.L, ZeptoMetrix i University of Washington.

Wszystkie szczepy i użyty materiał referencyjny zostały prawidłowo wykryte w odpowiednim kanale, a EIC wykazała amplifikację o wartości $Ct \leq 40$.

12.4.2. Precyzja

Aby określić precyzję testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, przeprowadzono Testy wewnątrzseryjne (powtarzalność), międzyseryjne, międzypartiowe i międzyprzrzędowe (odtwarzalność) z wykorzystaniem sztucznej macierzy zmian skórnych z dodatkiem referencyjnych szczepów ludzkiego herpeswirusa typu 1, szczep KOS (ATCC® VR-1493, nr ref. FR-310

(IRR)), wirusa opryszczki pospolitej (Herpes simplex) typu 2, szczep MS (nr ref. 0810006CF (Zeptomatrix)) i bakterii *Treponema pallidum*, szczep SS14 (University of Washington).

Testy wewnętrzzeryjne

Testy wewnętrzzeryjne przeprowadzono poprzez analizę sześciu replikatów wszystkich próbek w tej samej serii z użyciem testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

Podsumowanie wyników przedstawiono w poniższej tabeli.

Wykrywany element	Kanał	Rodzaj próbki	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV%
HSV-1	475/520 (FAM)	3 × LoD	33,32	0,49	1,48
		5 × LoD	32,93	0,12	0,37
		Kontrola ujemna	NEG	NIE DOTYCZY	NIE DOTYCZY
HSV-2	530/565 (HEX)	3 × LoD	31,08	0,40	1,28
		5 × LoD	32,00	0,24	0,74
		Kontrola ujemna	NEG	NIE DOTYCZY	NIE DOTYCZY
EIC	585/630 (ROX)	3 × LoD	30,42	0,15	0,48
		5 × LoD	29,90	0,48	1,60
		Kontrola ujemna	NEG	NIE DOTYCZY	NIE DOTYCZY
<i>Treponema pallidum</i>	630/665 (Cy5)	3 × LoD	34,17	0,55	1,61
		5 × LoD	31,95	0,43	1,35
		Kontrola ujemna	NEG	NIE DOTYCZY	NIE DOTYCZY

Tabela 18. Wyniki testów wewnętrzzeryjnych w przypadku testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = cykl progowy, ($\bar{x}$) = średnia arytmetyczna wartość Ct, (σ) = odchylenie standardowe, (CV%) = współczynnik zmienności, NEG = ujemny, N/A = nie dotyczy.

Testy międzyseryjne

Testy międzyseryjne przeprowadzono poprzez wykonanie analizy czterech replikatów różnych próbek w trzech różnych dniach przez trzech różnych operatorów z użyciem testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Podsumowanie wyników przedstawiono w poniższej tabeli.

Wykrywany element	Kanał	Rodzaj próbki	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV%
HSV-1	475/520 (FAM)	3 × LoD	33,21	0,47	1,41
		5 × LoD	31,85	0,78	2,43
		Kontrola ujemna	NEG	NIE DOTYCZY	NIE DOTYCZY
HSV-2	530/565 (HEX)	3 × LoD	33,83	0,56	1,66
		5 × LoD	32,68	0,48	1,48
		Kontrola ujemna	NEG	NIE DOTYCZY	NIE DOTYCZY
EIC	585/630 (ROX)	3 × LoD	29,82	0,43	1,43
		5 × LoD	29,94	0,40	1,33
		Kontrola ujemna	29,78	0,46	1,54
	630/665	3 × LoD	32,61	1,07	3,29

<i>Treponema pallidum</i>	(Cy5)	5 x LoD	31,86	1,24	3,88
		Kontrola ujemna	NEG	NIE DOTYCZY	NIE DOTYCZY

Tabela 19. Wyniki testów międzyseryjnych w przypadku testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = cykl progowy, ($\bar{x}$) = średnia arytmetyczna wartość Ct, (σ) = odchylenie standardowe, (CV%) = współczynnik zmienności, NEG = ujemny, N/A = nie dotyczy.

Testy międzypartiotowe

Wartości z testów międzypartiotowych określono na podstawie sześciu replikatów różnych próbek z użyciem trzech partii testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Podsumowanie wyników przedstawiono w poniższej tabeli.

Wykrywany element	Kanał	Rodzaj próbki	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV%
HSV-1	475/520 (FAM)	3 x LoD	33,26	0,46	1,38
		5 x LoD	33,29	0,33	1,00
		Kontrola ujemna	NEG	NIE DOTYCZY	NIE DOTYCZY
HSV-2	530/565 (HEX)	3 x LoD	30,98	0,86	2,78
		5 x LoD	32,70	0,58	1,79
		Kontrola ujemna	NEG	NIE DOTYCZY	NIE DOTYCZY
EIC	585/630 (ROX)	3 x LoD	30,04	0,57	1,89
		5 x LoD	30,26	0,56	1,86
		Kontrola ujemna	29,97	0,69	2,31
<i>Treponema pallidum</i>	630/665 (Cy5)	3 x LoD	33,53	0,76	2,26
		5 x LoD	32,24	0,55	1,69
		Kontrola ujemna	NEG	NIE DOTYCZY	NIE DOTYCZY

Tabela 20. Wyniki międzypartiotowe w przypadku testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = cykl progowy, ($\bar{x}$) = średnia arytmetyczna wartość Ct, (σ) = odchylenie standardowe, (CV%) = współczynnik zmienności, NEG = ujemny, N/A = nie dotyczy.

Testy międzyprzrzędowe

Wartości z testów międzyprzrzędowych określono na podstawie czterech replikatów tych samych próbek użytych do testów wewnątrzseryjnych, międzyseryjnych i międzypartiotowych przy użyciu testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System i trzech różnych systemów BD MAX™ System. Podsumowanie wyników przedstawiono w poniższej tabeli.

Wykrywany element	Kanał	Rodzaj próbki	Ct ($\bar{x}$)	σ	CV%
HSV-1	475/520 (FAM)	3 x LoD	33,71	0,52	1,54
		5 x LoD	32,68	0,59	1,79
		Kontrola ujemna	NEG	NIE DOTYCZY	NIE DOTYCZY
HSV-2	530/565 (HEX)	3 x LoD	33,56	0,80	2,39
		5 x LoD	32,65	0,42	1,28
		Kontrola ujemna	NEG	NIE DOTYCZY	NIE DOTYCZY
EIC	585/630	3 x LoD	29,51	0,77	2,59

<i>Treponema pallidum</i>	(ROX)	5 x LoD	29,23	0,39	1,33
		Kontrola ujemna	29,98	0,52	1,75
	630/665 (Cy5)	3 x LoD	32,28	0,62	1,93
		5 x LoD	31,19	0,40	1,29
		Kontrola ujemna	NEG	NIE DOTYCZY	NIE DOTYCZY

Tabela 21. Wyniki międzyprzrzędowe w przypadku testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = cykl progowy, ($\bar{x}$) = średnia arytmetyczna wartość Ct, (σ) = odchylenie standardowe, (CV%) = współczynnik zmienności, NEG = ujemny, N/A = nie dotyczy.

Podsumowując, badanie precyzji potwierdziło rzetelność i spójność działania testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

12.4.3. Dokładność

Eksperyment dotyczący dokładności przeprowadzono poprzez analizę paneli z programów zewnętrznej oceny jakości (EQA). Analizom poddawano próbki zawierające wirusa HSV-1, wirusa HSV-2 lub bakterię *T. pallidum* oprócz innych mikroorganizmów niebędących wykrywanym elementem. Wszystkie wyniki testów przedstawione w tabeli poniżej porównano z raportami końcowymi dostarczonymi przez podmioty odpowiedzialne za programy EQA.

Wykrywany element	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)

Tabela 22. Wyniki dotyczące dokładności testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (ORA) = zgodność ogólna, (TP) = wynik prawdziwie dodatni, (TN) = wynik prawdziwie ujemny, (FP) = wynik fałszywie dodatni, (FN) = wynik fałszywie ujemny, (PPA) = odsetek zgodności wyników dodatnich, (NPA) = odsetek zgodności wyników ujemnych.

Podsumowując, test VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System zapewnia wysoką dokładność w wykrywaniu DNA wirusa HSV-1, wirusa HSV-2 i bakterii *T. pallidum* z doskonałymi parametrami NPA i PPA w przypadku wszystkich badanych szczepów.

12.5. Swoistość i reaktywność analityczna

Ocenę swoistości i reaktywności analitycznej testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System przeprowadzono *in silico* oraz eksperymentalnie przy użyciu różnych materiałów wyjściowych, takich jak certyfikowane szczepy referencyjne, certyfikowane referencyjne RNA/DNA oraz materiał z programów EQA.

12.5.1. Swoistość analityczna

Swoistość analityczna to zdolność testu do detekcji zamierzonego wykrywanego elementu. Należy brać pod uwagę cztery składniki specyficzności analitycznej: reaktywność krzyżową, współzakażenie, zakłócanie

przez czynniki mikrobiologiczne i zakłócanie przez substancje. Gdy w próbce pacjenta obecne są mikroorganizmy spokrewnione genetycznie, może wystąpić reaktywność krzyżowa, a jeśli obecność tych mikroorganizmów zmieni wykrywanie mikroorganizmów będących przedmiotem wykrywania, dochodzi do zakłócania wyników testu przez czynniki mikrobiologiczne. Podobnie badanie w warunkach współzakażenia ma na celu ocenę, czy będące wykrywanym elementem mikroorganizmy obecne w różnych stężeniach w tej samej próbce mogłyby zmienić wykrywanie między nimi. Wreszcie jeśli występowanie określonych substancji potencjalnie obecnych w macierzy próbki wpływa na działanie testu qPCR, może dochodzić do zakłócania oznaczeń przez substancje.

Analiza reaktywności krzyżowej *in silico*

Reaktywność krzyżową oceniano przy użyciu sekwencji referencyjnych czynników chorobotwórczych z bazy danych NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) oraz narzędziami do wyszukiwania podobieństwa takimi jak wewnętrzne oprogramowanie do analizy bioinformatycznej BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

W przedstawionych wynikach uwzględniono wyłącznie sekwencje o procentowym stopniu homologiczności powyżej 80%. Uznano, że mało prawdopodobne jest wykrycie podobnych sekwencji o procentowym stopniu podobieństwa mniejszym niż 80% homologiczności.

Treponema pallidum

Wszystkie analizowane sekwencje wykazywały homologiczność poniżej 80% w przypadku zestawu primerów i sond *T. pallidum*.

Analiza reaktywności krzyżowej *in silico* wykazała 100-procentową homologiczność z bakterią *Treponema paraluiscluniculi* (identyfikator taksonomiczny: 53435 i 545766). Jednak zgodnie z wyszukiwaniem w bazie danych NCBI sekwencje te okazały się być synonimami heterotypowymi (inaczej: taksonomicznymi) i również odpowiadają *Treponema pallidum*.

W związku z tym żadna z analizowanych sekwencji, w tym te wykazujące homologiczność powyżej 80%, nie mogłaby wpływać na prawidłowe wykrywanie bakterii *Treponema pallidum*.

Ludzki herpeswirus alfa typu 1

Wszystkie analizowane sekwencje wykazywały homologiczność poniżej 80% w przypadku zestawu primerów i sond HSV-1.

Analiza reaktywności krzyżowej *in silico* wykazała 98,33% homologiczności z szympansem herpeswirusem alfa typu 1, szczep 105640 (identyfikator taksonomiczny: 332937). Nosicielem tego szczepu herpeswirusa alfa jest szympan (*Pan troglodytes*). Herpeswirusy są wysoce swoiste dla nosiciela i wraz z nim podlegają

synchronicznej ewolucji. Wirus ten nie został zidentyfikowany u ludzi i obecnie nie uważa się go za wirusa zoonotycznego, więc nie wpływa na wykrywanie wirusa HSV-1.

W związku z tym żadna z analizowanych sekwencji, w tym te wykazujące homologiczność powyżej 80%, nie mogłaby wpływać na prawidłowe wykrywanie wirusa HSV-1.

Ludzki herpeswirus alfa typu 2

Wszystkie analizowane sekwencje wykazywały homologiczność poniżej 80% w przypadku zestawu primerów i sond HSV-2.

Podsumowując, struktury wykrywanych elementów w postaci wirusa HSV-1, wirusa HSV-2 i bakterii *T. pallidum* w teście VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System nie powinny powodować uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich w przypadku wykrywania bakterii *Treponema pallidum*, ludzkiego herpeswirusa alfa typu 1 i ludzkiego herpeswirusa alfa typu 2 w obecności innych organizmów.

Swoistość analityczna badania eksperymentalne

Reaktywność krzyżowa badania eksperymentalne

Reaktywność krzyżową testu VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System potwierdzono, testując panel różnych mikroorganizmów związanych z objawami zakażeń przenoszonych drogą płciową lub mikroorganizmów istotnych pod względem środowiskowym i filogenetycznym. W miarę możliwości i dostępności danych dotyczących stężenia zakłócające mikroorganizmy oceniano w istotnych klinicznie stężeniach (zwykle od 1E+05 do 1E+06 CFU/ml (jednostki tworzące kolonię)/ml w przypadku bakterii/grzybów i od 1E+04 do 1E+05 PFU/ml (jednostki tworzące łysinkę)/ml w przypadku wirusów). Nie wykryto reaktywności krzyżowej w odniesieniu do żadnego z poniższych przebadanych mikroorganizmów, z wyjątkiem mikroorganizmów stanowiących wykrywany element.

Badanie reaktywności krzyżowej					
<i>Acinetobacter baumannii</i> 5377 [NCDC KC 755]	-	<i>Haemophilus influenzae</i> , szczep L-378	-	<i>Listeria monocytogenes</i> , serotyp 4b	-
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius 1863 CECT 2071	-	Wirus zapalenia wątroby typu A HM175/18f	-	Wirus małpiej ospy	-
<i>Atopobium vaginae</i>	-	Herpes Simplex Virus type-1 1st WHO IS for HSV-1	+	<i>Mycoplasma genitalium</i> , szczep M30	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Herpes Simplex Virus type-2 1st WHO IS for HSV-2	+	<i>Mycoplasma hominis</i> , szczep LBD-4	-
<i>Candida albicans</i>	-	Wirus opryszczki pospolitej typu 2, szczep MS	+	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , szczep NCTC 8375 [B 5025]	-
<i>Candida glabrata</i>	-	Ludzki herpeswirus typu 1, szczep HF	+	<i>Neisseria meningitidis</i> , szczep M2091	-
<i>Candida krusei</i> Issatchenkia orientalis Kudryavtsev 1960 CECT 1433	-	Ludzki herpeswirus typu 1, szczep F	+	<i>Proteus mirabilis</i> NCDC 2059-70	-

Badanie reaktywności krzyżowej					
<i>Candida parapsilosis</i>	-	Ludzki herpeswirus typu 1, szczep KOS (ATCC-VR-1493)	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , szczep RH 815	-
<i>Candida tropicalis</i> (Castellani) Berkhout 1923 CECT 1005	-	Ludzki herpeswirus typu 1, szczep MacIntyre	+	<i>Serratia marcescens</i> subsp.marcescens	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotyp E	-	Ludzki herpeswirus typu 2, szczep ATCC-2011-2	+	<i>Staphylococcus aureus</i> , subsp.Aureus, szczep Seattle 1945	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Ludzki herpeswirus typu 2, szczep G	+	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , szczep 810-2	-
<i>Enterobacter cloacae</i> , subsp.cloacae	-	Ludzki wirus brodawczaka 16	-	<i>Treponema pallidum</i> DNA Control, Vircell	+
<i>Enterococcus faecalis</i> , szczep typu CECT 8120	-	Ludzki wirus brodawczaka 18	-	<i>Treponema pallidum</i> , szczep Nichols	+
<i>Enterococcus faecium</i> , fenotyp vanA, szczep CECT 5253	-	<i>Klebsiella oxytoca</i> , szczep MIT 10-5243	-	<i>Treponema pallidum</i> , szczep SS14	+
Epstein-Barr Virus 1st WHO IS for Epstein-Barr Virus EBV	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , szczep UHKPC57	-	<i>Trichomonas vaginalis</i> , QCMD TV18S-01	-
Szczep typu <i>Escherichia coli</i>	-	<i>Listeria innocua</i>	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i> , szczep T 960 (CX8) [960, CIP 103755, NCTC 10177]	-
<i>Gardnerella vaginalis</i> 594 [NCTC 10287]	-	<i>Listeria ivanovii</i> , subsp.londoniensis	-	Wirus ospy wietrznej i półpaśca, szczep Ellen	-
<i>Haemophilus ducreyi</i> , klasa I	-	<i>Listeria monocytogenes</i> , serotyp 1/2	-		

Tabela 23. Referencyjne patogenne mikroorganizmy uwzględnione w teście reaktywności krzyżowej. Wynik + lub – odnosi się do wyniku dodatniego lub ujemnego uzyskanego w różnych kanałach, w zależności od wykrytego celu. W przypadku, gdy badany mikroorganizm jest jednym z celów wykrywanych przez wyrób, w odpowiadającym mu kanale uzyskuje się wynik dodatni, a w pozostałych kanałach uzyskuje się wynik ujemny.

Podsumowując, wyniki testów reaktywności krzyżowej wskazują na wysoką swoistość testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, co minimalizuje ryzyko uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich. Ponieważ nie zaobserwowano nieswoistych amplifikacji z innymi powiązanymi mikroorganizmami, sugeruje to, że wyrób jest w stanie dokładnie rozróżniać wykrywane elementy.

Badanie współzakażenia

Przeprowadzono badanie w warunkach współzakażenia z wykorzystaniem ludzkiego herpeswirusa typu 1, szczep KOS (ATCC® VR-1493, nr ref. FR-310 (IRR)), wirusa opryszczki pospolitej (Herpes Simplex) typu 2, szczep MS (nr ref. 0810006CF (Zeptomatrix)) i bakterii *Treponema pallidum*, szczep SS14 (University of Washington) w różnych stężeniach w celu potwierdzenia, że obecność któregośkolwiek z nich, niezależnie od stężenia, nie zmienia wykrywalności między nimi. Przeanalizowano trzy próbki ujemnej naturalnej macierzy zmian skórnych z dodatkiem materiału referencyjnego o niskim stężeniu ($3 \times \text{LoD}$) w przypadku jednego z wykrywanych elementów i o bardzo wysokim stężeniu (zwykle od $1\text{E}+04$ do $1\text{E}+05$ jednostek/ml, jeśli możliwe) w przypadku pozostałych wykrywanych elementów.

Wyniki potwierdzają, że detekcja mikroorganizmów docelowych nie uległa zmianie w warunkach współzakażenia w przypadku analizy za pomocą testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System przy różnych stężeniach.

Badanie zakłócających czynników mikrobiologicznych

Przeprowadzono badanie zakłócania mikrobiologicznego, aby przeanalizować potencjalne czynniki mikrobiologiczne mogące zakłócać działanie testu VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Przetestowano panel różnego rodzaju mikroorganizmów istotnych klinicznie, środowiskowo i filogenetycznie w obecności wykrywanych elementów w postaci wirusa HSV-1, wirusa HSV-2 i bakterii *T. pallidum* z wykorzystaniem naturalnej macierzy zmian skórnych z dodatkiem ludzkiego herpeswirusa typu 1, szczep KOS (ATCC® VR-1493, nr ref. FR-310 (IRR)), wirusa opryszczki pospolitej (Herpes simplex) typu 2, szczep MS (nr ref. 0810006CF (Zeptomatrix)) i bakterii *Treponema pallidum*, szczep SS14 (University of Washington). W miarę możliwości oraz dostępności danych dotyczących stężenia wirusy, bakterie i/lub grzyby oceniano w klinicznie istotnych stężeniach (zwykle od 1E+05 do 1E+06 CFU/ml (jednostki tworzące kolonię)/ml w przypadku bakterii/grzybów i od 1E+04 do 1E+05 PFU/ml (jednostki tworzące łyśinkę)/ml w przypadku wirusów).

Jako kontrole testu uwzględniono pozytywną kontrolę macierzy (ang. Positive Matrix Control, PMC) i negatywną kontrolę macierzy (ang. Negative Matrix Control, NMC). PMC odpowiada ujemnej macierzy bez żadnego zakłócającego czynnika mikrobiologicznego, ale z dodatkiem swoistych szczepów stanowiących wykrywany element, natomiast NMC odpowiada ujemnej macierzy bez żadnego zakłócającego czynnika mikrobiologicznego.

Nazwa mikroorganizmu	Przetestowane stężenie	Wynik
PMC	NIE DOTYCZY	N.I.
NMC	NIE DOTYCZY	N.I.
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Niedostępne	N.I.
<i>Atopobium vaginae</i>	4,52E+03 jtk/μl	N.I.
<i>Candida albicans</i>	4,18E+03 jtk/μl	N.I.
<i>Candida glabrata</i>	2,46E+03 jtk/μl	N.I.
<i>Candida parapsilosis</i>	Niedostępne	N.I.
<i>Candida tropicalis</i>	3,04E+04 kopie/μl	N.I.
<i>Chlamydia trachomatis</i> , serotyp E	3,20E+06 jtw/ml	N.I.
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,28E+03 jtk/μl	N.I.
1st WHO IS for Epstein-Barr Virus EBV	5,00E+04 j.m./μl	N.I.
<i>Gardnerella vaginalis</i> 594 [NCTC 10287]	4,40E+05 jtk/ml	N.I.
<i>Haemophilus ducreyi</i> , klasa I	1,40E+02 kopie/μl	N.I.
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,20E+03 jtk/μl	N.I.
Wirus wirusowego zapalenia wątroby typu A	2,80E+03 TCID50/μl	N.I.
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Niedostępne	N.I.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Niedostępne	N.I.
<i>Listeria innocua</i>	Niedostępne	N.I.
<i>Listeria ivanovii</i> , subsp.londoniensis	Niedostępne	N.I.
<i>Listeria monocytogenes</i> (CECT 4031)	2,90E+03 jtk/μl	N.I.

<i>Listeria monocytogenes</i> (CECT 935)	2,70E+03 jtk/ μ l	N.I.
<i>Mycoplasma hominis</i>	4,40E+03 jtk/ μ l	N.I.
<i>Mycoplasma genitalium</i>	3,80E+03 jtk/ μ l	N.I.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6,20E+03 jtk/ μ l	N.I.
<i>Neisseria meningitidis</i>	5,70E+04 jtk/ μ l	N.I.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,90E+04 jtk/ μ l	N.I.
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,60E+04 jtk/ μ l	N.I.
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	9,20E+03 jtk/ μ l	N.I.
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	2,00E+04 jtk/ μ l	N.I.
<i>Acinetobacter baumannii</i> 5377 [NCDC KC 755]	8,10E+05 jtk/ml	N.I.
<i>Bacteroides fragilis</i>	3,40E+02 kopie/ μ l	N.I.
Szczep typu <i>Enterococcus faecalis</i>	5,00E+05 jtk/ml	N.I.
<i>Enterococcus faecium</i> , fenotyp vanA	3,50E+05 jtk/ml	N.I.
Ludzki wirus brodawczaka 16	1,00E+03 j.m./ μ l	N.I.
Ludzki wirus brodawczaka 18	1,00E+03 j.m./ μ l	N.I.
<i>Serratia marcescens</i>	2,30E+05 jtk/ml	N.I.
Wirus ospy wietrznej i półpaśca	7,26E+04 jtk/ml	N.I.
Szczep typu <i>Citrobacter freundii</i>	6,20E+02 jtk/ μ l	N.I.
Szczep typu <i>Escherichia coli</i>	5,20E+02 jtk/ μ l	N.I.
<i>Proteus mirabilis</i>	2,55E+01 jtk/ μ l	N.I.
Wirus małpiej ospy	1,50E+03 kopii/ml	N.I.

Tabela 24. Badanie zakłócających czynników mikrobiologicznych. N.I. = brak zakłócania, (PMC) = Positive Matrix Control, (NMC) = Negative Matrix Control, (TCID₅₀): dawka zakaźna dla 50% hodowli tkankowej, (j.m.): jednostki międzynarodowe, (jtk): jednostki tworzące kolonię, (kopie): kopie/kopii, (j.z.): jednostka zakaźna.

Podsumowując, nie zaobserwowano żadnych zakłóceń w wykrywaniu docelowego kwasu nukleinowego przez którykolwiek z badanych mikroorganizmów.

Badanie substancji zakłócających

Przeprowadzono badanie substancji zakłócających, aby sprawdzić potencjalny wpływ zakłócania działania testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System przez substancje endogenne i egzogenne. Łącznie 22 potencjalnie zakłócających substancji dodano do ujemnej naturalnej macierzy zmian skórnych wzbogaconej następującymi szczepami referencyjnymi: ludzki herpeswirus typu 1, szczep KOS (ATCC® VR-1493, nr ref. FR-310 (IRR)), wirus opryszczki pospolitej (Herpes simplex) typu 2, szczep MS (nr ref. 0810006CF, Zeptomatrix) i bakteria *Treponema pallidum*, szczep SS14 (University of Washington); analizę wykonano z użyciem sześciu replikatów.

Jako kontrole testu uwzględniono pozytywną kontrolę macierzy (ang. Positive Matrix Control, PMC) i negatywną kontrolę macierzy (ang. Negative Matrix Control, NMC). PMC odpowiada ujemnej macierzy bez żadnej zakłócającej substancji, ale z dodatkiem swoistych szczepów stanowiących docelowy element,

natomiast NMC odpowiada ujemnej macierzy bez żadnej zakłócającej substancji i bez dodatku mikroorganizmów / materiału referencyjnego. Uzyskano następujące wyniki:

Nazwa substancji	Przetestowane stężenie	Wynik
PMC	NIE DOTYCZY	N.I.
NMC	NIE DOTYCZY	N.I.
Acyklowir	6,60E-02 mg/ml	N.I.
Albumina	1,00E+01 mg/ml	N.I.
Krew pełna	1,00E+00% (v/v)	N.I.
Leukocyty/monocyty	1,00E+06 komórek/ml	N.I.
Mucyna	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Clamiox (hydrokortyzon)	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Neosayomol (difenhydramina)	3,87E-02 mg/ml	N.I.
Letibalm (balsam do ust)	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Kazeina	7,00E+00 mg/ml	N.I.
Hemoal (benzokaina)	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Durex Frescor	5,00E+01 µl/ml	N.I.
Olejek intymny Intim Oil firmy SOIVRE	5,00E+01 µl/ml	I
	1,25E+01 µl/ml	N.I.
Liade	7,20E+00 mg/ml	N.I.
Mocz kobiecy	1,00E+01% (v/v)	N.I.
Mocz męski	1,00E+01% (v/v)	N.I.
Kął	2,20E-01% (v/v)	N.I.
Płyn nasienny	5,00E+00% (v/v)	N.I.
Halibut	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Krem Vagisil	7,50E-01 mg/ml	N.I.
Skrobia kukurydziana	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Talquistina	2,64E+00% (v/v)	I
	6,60E-01% (v/v)	I
	3,30E-01% (v/v)	I
	1,70E-01% (v/v)	N.I.
Tiokonazol	2,50E+00 mg/ml	N.I.

Tabela 25. Substancje potencjalnie zakłócające. N.I.: brak zgłaszanych zakłóceń/ I: występowanie zakłóceń.

Z użyciem testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System przebadano różnego rodzaju potencjalnie zakłócające substancje – zarówno endogenne, jak i egzogenne. Działanie zakłócające zaobserwowano podczas testu olejku intymnego Intim Oil firmy SOIVRE w stężeniu 50 µl/ml i kremu Talquistina w stężeniu 2,64% (v/v). Wykonywano rozcieńczenia do momentu uzyskania stężenia, przy którym nie zaobserwowano już zakłócającego wpływu: 12,5 µl/ml w przypadku olejku intymnego Intim Oil firmy SOIVRE i 0,17% (v/v) w przypadku kremu Talquistina. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że przy badanych stężeniach końcowych nie obserwuje się zakłóceń przez żadną z ocenianych substancji.

12.5.2. Reaktywność analityczna

Reaktywność analityczną można zdefiniować jako odsetek docelowych szczepów drobnoustrojów lub próbek DNA/RNA, które dają prawidłowy wynik dodatni. Reaktywność analityczną badano *in silico* oraz metodą badań eksperymentalnych.

Analiza reaktywności analitycznej *in silico*

Reaktywność analityczną testu VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System oceniano przy użyciu publicznie dostępnej bazy danych sekwencji nukleotydowych NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) oraz wewnętrznego oprogramowania do analizy bioinformatycznej, aby wykazać, że badany wyrób jest zdolny do prawidłowej detekcji genów wykrywanych elementów. Analizę *in silico* struktur primerów i sondy przeprowadzono poprzez wyszukiwanie podobieństwa względem łącznie 4941 analizowanych sekwencji (pobranych z bazy danych, z usunięciem duplikatów) w przypadku bakterii *T. pallidum*, 9779 w przypadku wirusa HSV-1 i 8689 w przypadku wirusa HSV-2. Uzyskane wyniki przedstawiono w poniższej tabeli:

<i>Treponema pallidum</i>					
Gen	Dopasowane sekwencje: 607				
	Bez rozbieżności (mismatches)	Z rozbieżnościami (mismatches)	Sekwencje z potwierdzonym wykrywaniem	Sekwencje bez wykrywania	Sekwencje o nieznanym statusie wykrywania
<i>16S rRNA</i>	99,84%	0,16%	99,84%	0%	0,16%
Ludzki herpeswirus alfa typu 1					
Gen	Dopasowane sekwencje: 513				
	Bez rozbieżności (mismatches)	Z rozbieżnościami (mismatches)	Sekwencje z potwierdzonym wykrywaniem	Sekwencje bez wykrywania	Sekwencje o nieznanym statusie wykrywania
<i>UL1</i>	87,33%	12,67%	97,66%	0%	2,34%
Ludzki herpeswirus alfa typu 2					
Gen	Dopasowane sekwencje: 549				
	Bez rozbieżności (mismatches)	Z rozbieżnościami (mismatches)	Sekwencje z potwierdzonym wykrywaniem	Sekwencje bez wykrywania	Sekwencje o nieznanym statusie wykrywania
<i>US4</i>	93,44%	6,56%	93,44%	0%	6,56%

Tabela 26. Ocena reaktywności analitycznej *in silico* „Sekwencje podobne” = liczba sekwencji wyszukanych jako podobne bez rozbieżności lub z rozbieżnościami z całkowitej liczby sekwencji poddanych analizie, „sekwencje z potwierdzonym wykrywaniem” = sekwencje bez rozbieżności lub przebadane metodą analiz mokrych z gwarantowanym wykrywaniem, „sekwencje bez wykrywania” = sekwencje poddane wcześniejszej analizie *in silico*, w przypadku których wykrywanie eksperymentalne nie może być zagwarantowane z powodu wcześniejszych niepotwierdzających tego dowodów eksperymentalnych, „sekwencje o nieznanym statusie wykrywania” = sekwencje poddane wcześniejszej analizie *in silico*, w przypadku których wykrywanie eksperymentalne nie może być zagwarantowane z powodu braku dowodów eksperymentalnych.

Podsumowując, analiza inkluzyjności wykazała prawidłowe wykrywanie genów *16S rRNA*, *UL1* i *US4* odpowiednio w przypadku bakterii *T. pallidum*, wirusa HSV-1 i wirusa HSV-2 za pomocą testu VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

Reaktywność analityczna, badania eksperymentalne

Reaktywność analityczną testu VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System w przypadku wirusa HSV-1 oceniano w odniesieniu do DNA ludzkiego herpeswirusa typu 1, szczep HF (kod ATCC VR-260), ludzkiego herpeswirusa typu 1, szczep MacIntyre (kod ATCC VR-539), ludzkiego herpeswirusa typu 1, szczep F (kod ATCC VR-733) i międzynarodowego standardu Światowej Organizacji Zdrowia 1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-1 (HSV-1) (NIBSC 16/368), uzyskując wyniki dodatnie.

Reaktywność analityczną testu VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System w przypadku wirusa HSV-2 oceniano w odniesieniu do DNA ludzkiego herpeswirusa typu 2, szczep G (kod ATCC VR-3393), ludzkiego herpeswirusa typu 2, szczep ATCC-2011-2 (kod ATCC VR-1779) i międzynarodowego standardu Światowej Organizacji Zdrowia 1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-2 (HSV-2) (NIBSC 17/122), uzyskując wyniki dodatnie.

Reaktywność analityczną testu VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System w przypadku bakterii *T. pallidum* oceniano w odniesieniu do DNA *Treponema pallidum*, szczep Nichols (University of Washington) i DNA z kontroli *Treponema pallidum* DNA Control (Vircell MBC109), uzyskując wyniki dodatnie.

12.6. Spójność metrologiczna

Ten test nie jest przeznaczony do celów pomiarowych.

13. Charakterystyki skuteczności klinicznej

Skuteczność kliniczną testu VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System oceniano z użyciem wymazów ze zmian skórnych z okolic odbytu i narządów płciowych oraz jamy ustnej pobieranych przez personel pielęgniarstwa za pomocą wymazówki Copan eSwab®. W celu pobrania próbek jałową wymazówkę (FLOQSwab) umieszczano w dołączonej fiolce zawierającej 1 ml podłoża Copan's Liquid Amies Elution Swab. Uzyskano następujące wyniki:

	Ośrodek	Rodzaj próbki	Przeływ pracy	Wykrywany element
1	Certest Biotec S.L. (Saragossa, Hiszpania) we współpracy ze szpitalem Hospital Universitario Miguel Servet (Saragossa, Hiszpania), z wykorzystaniem próbek z banku materiału biologicznego Biobanco del Sistema de Salud de Aragón (BSSA)	Wymaz ze zmian skórnych z okolic odbytu i narządów płciowych oraz jamy ustnej (Badanie retrospektywne)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	HSV-1
				HSV-2
				<i>T. pallidum</i>
2	Certest Biotec S.L. (Saragossa, Hiszpania) przy użyciu próbek z firmy Cerba Xpert	Wymaz ze zmian skórnych z okolic odbytu i narządów płciowych oraz jamy ustnej (Badanie retrospektywne)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	HSV-1
				HSV-2
				<i>T. pallidum</i>

Tabela 27. Ośrodek, rodzaj próbki, przeływ pracy i wykrywany element.

Obliczono w przypadku testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System wartości prawdziwie dodatnie i ujemne, wartości fałszywie dodatnie i ujemne, wartości predykcyjne wyniku dodatniego (PPV), wartości predykcyjne wyniku ujemnego (NPV) oraz wskaźniki wiarygodności (LR). Wyniki i analizy z różnych badań zostały zestawione jako pojedyncza wartość referencyjna ze względu na to, iż oba badania wykorzystywały tę samą metodę referencyjną, ten sam rodzaj próbek oraz takie same kryteria włączenia/wyłączenia. Wyniki przedstawiono w poniższej tabeli:

Ośrodek	Test porównawczy	Wykrywany element	TP	TN	FP	FN	Czułość	Swoistość	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)

Tabela 28. Wartości prawdziwie dodatnie (TP) i prawdziwie ujemne (TN), wartości fałszywie dodatnie (FP) i fałszywie ujemne (FN), czułość, swoistość, wartości predykcyjne wyniku dodatniego (PPV), wartości predykcyjne wyniku ujemnego (NPV) oraz wskaźniki wiarygodności (LR) w przypadku testu VIASURE *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

Podsumowując, wyniki wykazują wysoką zgodność w zakresie wykrywania wirusa HSV-1, wirusa HSV-2 i bakterii *T. pallidum* za pomocą testu 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>
- Światowa Organizacja Zdrowia. (2023). *Herpes Simplex Virus*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>
- Zhu, S., & Viejo-Borbolla, A. (2021). Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence*, 12(1), 2670–2702. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1982373>

Symbole składników i odczynników do diagnostyki *in vitro* (IVD)

 Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>	 Przechowywać w suchym miejscu	 Użyć przed	 Producent	 Kod partii
 Zapoznać się z instrukcją obsługi	 Graniczne wartości temperatury	 Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów	 Niepowtarzalny identyfikator wyrobu	 Numer katalogowy
 Oznakowanie CE	 Chronić przed światłem słonecznym			

Znaki towarowe

BD MAX™ jest zarejestrowanym znakiem handlowym firmy Becton, Dickinson and Company.

Zastrzeżone prawa do modyfikacji. Wszelkie prawa zastrzeżone. © Certest Biotec, S.L.

Wszelkie pozostałe znaki towarowe, które mogą występować w niniejszej ulotce dołączanej do opakowania stanowią własność odpowiednich właścicieli.



Certest Biotec, S.L.

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

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

Informacje o sponsorze australijskim:

Becton Dickinson Pty Ltd., 66 Waterloo Road.
Macquarie Park NSW 2113, Australia

Informacje o sponsorze nowozelandzkim:

Becton Dickinson Limited, 14B George Bourke Drive.
Mt. Wellington Auckland 1060, Nowa Zelandia

Kontrola zmian		
Wersja nr	Zmiany	Data
00	Wersja oryginalna Niniejsza wersja jest tłumaczeniem oryginalnego dokumentu w języku angielskim: IUo-444222en0725.00.	27.7.2025 r.

Tabela A 2. Tabela kontrolna zmian.

Wersja: 00

VIASURE

by **certest**

