

Real Time PCR Detection Kit

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

Instruções de utilização

CE IVD
2797

Estas Instruções de utilização aplicam-se às seguintes referências:

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

Tabela A 1. Referência do produto a usar com o 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 πρόσθιτες 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 reikiama 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 käyttööpas osoitteesta certest.es/viasure/labeling. Kun olet siellä, seuraa ohjeita. Jos tarvitset lisätietoja, ota yhteyttä: viasure@certest.es.

Consulte certest.es/viasure/labeling caso o seu idioma não se encontre na lista. Contacte viasure@certest.es caso o seu idioma não se encontre no website.

Nota: O utilizador deve notificar o fabricante e as autoridades competentes do Estado-Membro no qual está estabelecido como utilizador e/ou doente de qualquer incidente grave relacionado com o produto.

Índice

1. Finalidade prevista	6
2. Resumo e explicação.....	6
3. Princípio do procedimento	7
4. Reagentes fornecidos.....	8
5. Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos	8
6. Condições de transporte, armazenamento e utilização	9
7. Precauções para o utilizador	9
8. Procedimento do ensaio	11
8.1. Colheita, transporte e conservação de amostras	11
8.2. Preparação da amostra e extração de DNA	12
8.3. Protocolo de PCR	13
8.3.1. Programação do ensaio de PCR para o VIASURE HSV-1, HSV-2 & <i>Treponema pallidum</i> Assay for BD MAX™ System	
13	
8.3.2. Preparação do suporte para tubos do BD MAX™ System	16
8.3.3. Configuração do instrumento BD MAX™	17
8.3.4. Relatório de resultados do BD MAX™	17
9. Interpretação dos resultados.....	18
10. Limitações do ensaio.....	19
11. Controlo de qualidade	21
12. Características de desempenho analítico	21
12.1. Linearidade analítica	21
12.2. Sensibilidade analítica	22
12.2.1. Limite de Branco (LoB)	22
12.2.2. Limite de deteção (LoD)	23
12.3. Intervalo de medição.....	23
12.4. Exatidão	23
12.4.1. Veracidade	23
12.4.2. Precisão.....	25
12.4.3. Exatidão	27

12.5.	Especificidade e reatividade analítica	27
12.5.1.	Especificidade analítica	28
12.5.2.	Reatividade analítica	33
12.6.	Rastreabilidade metrológica	34
13.	Características de desempenho clínico	34
	Bibliografia.....	36
	Símbolos para componentes IVD e reagentes.....	37
	Marcas comerciais	37

PORTUGUÊS

1. Finalidade prevista

O VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System é um ensaio de qPCR automatizado concebido para a deteção qualitativa simultânea do DNA do vírus de herpes simples 1 (HSV-1), vírus de herpes simples 2 (HSV-2) e *Treponema pallidum* (Sífilis) em amostras de esfregaços de lesões cutâneas anogenitais e orais em doentes com suspeita de infecção por HSV-1, HSV-2 e *T. pallidum* pelo respetivo profissional de saúde (PS). Este ensaio destina-se a ser utilizado como um auxiliar no diagnóstico de infecção pelos microrganismos acima mencionados em combinação com os sinais e sintomas clínicos do doente e/ou fatores de risco epidemiológicos. Os resultados positivos indicam a presença de ácidos nucleicos (NA) alvo, mas não excluem a presença de outros agentes patogénicos não detetados pelo ensaio. Os resultados negativos não excluem a presença dos NA alvo, e não devem ser utilizados como único fundamento para o tratamento ou outras decisões de gestão do doente. O ensaio utiliza o sistema BD MAX™ para a extração automatizada de DNA e qPCR subsequente empregando os reagentes fornecidos em conjunto com reagentes universais e descartáveis para o sistema BD MAX™. O DNA é extraído das amostras, amplificado utilizando qPCR e detetado utilizando oligonucleótidos específicos e sondas marcadas com moléculas fluorescentes para HSV-1, HSV-2 e *T. pallidum*.

O produto destina-se a ser utilizado por pessoal de laboratório qualificado e com formação, especificamente instruído e treinado nas técnicas de PCR em tempo real e procedimentos de diagnóstico *in vitro* (incluindo formação no instrumento de PCR em tempo real (termociclador) e no sistema de extração de ácido nucleico).

2. Resumo e explicação

O vírus de herpes simples (HSV) humano tipos 1 e 2 são dois dos vírus mais prevalentes em todo o mundo, que estão geralmente associados a doenças tais como herpes labial, herpes genital, ceratite estromal herpética, meningite e encefalite (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). O HSV afeta principalmente a pele e as membranas mucosas, causando infecções persistentes consistindo em períodos de quiescência (latência) e doença recorrente (reativação) (Cole, 2020; Minaya et al., 2017). A transmissão do HSV-1 e do HSV-2 ocorre através do contacto oral, enquanto as infecções por HSV-2 ocorrem mais tarde, normalmente através de transmissão sexual, sendo as manifestações clínicas destes vírus altamente variáveis: assintomáticas, ligeiras ou potencialmente fatais (Cole, 2020; WHO, 2023; Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). Na maioria dos indivíduos imunocompetentes, o HSV causa doença ligeira e autolimitada (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). No entanto, a infecção por HSV também está associada a elevada morbilidade e mortalidade em certos indivíduos, tais como doentes imunocomprometidos que sofrem infecção recorrente por HSV (Cole, 2020; Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). Foi observado que uma infecção com um tipo de HSV gera tipicamente imunidade que previne a reinfeção com o mesmo serotípico, mas não com o outro (Zhu & Viejo-Borbolla, 2021).

A espiroqueta *Treponema pallidum* é reconhecida como o agente causador da sífilis venérea, bouba, sífilis endémica e pinta, todas elas infecções de múltiplas estágios que só podem ser distinguidos com base em critérios clínicos, epidemiológicos e geográficos (Mercuri et al., 2022; Peeling et al., 2023; Radolf et al., 2016; Tudor et al., 2022). A *T. p. pertenue* está associada

à framboesia, a *T. carateum* à pinta e a *T. p. endemicum* à sífilis endémica, mas a *T. pallidum* subespécie *pallidum* é a única subespécie associada à sífilis venérea (Mercuri et al., 2022; Tudor et al., 2022).

A sífilis progride através de múltiplos estágios, cada um apresentando sinais e sintomas distintos, tais como cancros duros na sífilis primária e erupções cutâneas ou úlceras na sífilis secundária (CDC, 2023; Mercuri et al., 2022; Peeling et al., 2023). De facto, devido à variedade de manifestações clínicas, a sífilis é apelidada de “a grande imitadora” (Peeling et al., 2023; Tudor et al., 2022). Esta doença tem afetado várias populações de risco ao longo da história, e embora tenha sido quase erradicada em 1998, a sua incidência tem vindo a aumentar desde 2000 (Mercuri et al., 2022).

É sempre aconselhável realizar ensaios para diferenciar o HSV-1 do HSV-2, uma vez que isto influencia tanto o prognóstico como o tratamento. Os CDC recomendam a confirmação do diagnóstico clínico com ensaios virológicos e serológicos específicos por tipo (Cole, 2020). Um método laboratorial fiável para o diagnóstico de infecções genitais agudas por HSV é a deteção de DNA de HSV-1 e HSV-2 através da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Cole, 2020). No que diz respeito ao *T. pallidum*, a deteção direta e os ensaios serológicos têm sido utilizados para o diagnóstico laboratorial, uma vez que este agente patogénico não pode ser cultivado (Forrestel et al., 2020). No entanto, os ensaios serológicos não são capazes de distinguir a sífilis de outras infecções treponémicas devido à elevada semelhança genética entre os treponemas patogénicos (Forrestel et al., 2020). As técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, como a PCR, permitem a deteção de DNA bacteriano em amostras clínicas nas fases iniciais da doença, oferecendo uma potencial estratégia para o controlo da epidemia de sífilis devido à sua elevada sensibilidade (Peeling et al., 2023).

3. Princípio do procedimento

O VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System foi concebido para a deteção qualitativa simultânea do DNA do vírus de herpes simples 1 (HSV-1), vírus de herpes simples 2 (HSV-2) e *Treponema pallidum* (Sífilis) em amostras de esfregaços de lesões cutâneas anogenitais e orais. Após o isolamento do DNA, a identificação de HSV-1, HSV-2 e *T. pallidum* é realizada pela amplificação de uma região conservada do gene *UL1 da glicoproteína L* do HSV-1, do gene *US4 da glicoproteína G* do HSV-2 e do gene *16S rRNA* do *T. pallidum*, utilizando oligonucleótidos específicos e sondas marcadas com fluorescência.

O VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System baseia-se na atividade de exonuclease 5' da polimerase do DNA. Durante a amplificação do DNA, esta enzima hidrolisa a sonda ligada à sequência de DNA complementar, separando o fluoróforo do *quencher*. Esta reação gera um aumento no sinal fluorescente que é proporcional à quantidade do modelo-alvo. Esta fluorescência é monitorizada no BD MAX™ System.

O VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System contém em cada tubo todos os componentes necessários para realizar o ensaio PCR em tempo real (oligonucleótidos/sondas específicos, dNTPs, tampão, polimerase) num formato estabilizado¹, bem como um Controlo Interno Endógeno (EIC) (gene *RNAse P humano*) para o seguimento da integridade da amostra, para monitorizar o processo de extração e/ou descartar a inibição da atividade da polimerase. Os

¹Tenha em atenção que os termos “estabilizado” e “lioofilizado” são utilizados de forma indistinta e como sinónimos ao longo de todo o documento.

genes de manutenção humanos estão envolvidos na manutenção celular básica e, por conseguinte, espera-se que estejam presentes em todas as células humanas nucleadas e mantenham níveis de expressão relativamente constantes.

Alvo	Canal	Gene
HSV-1	475/520	Gene glicoproteína L <i>UL1</i>
HSV-2	530/565	Gene glicoproteína G <i>US4</i>
<i>T. pallidum</i>	630/665	Gene 16S rRNA
Controlo Interno Endógeno (EIC)	585/630	<i>RNAse P</i>

Tabela 1. Alvo, canais e genes.

4. Reagentes fornecidos

VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System inclui os seguintes materiais e reagentes detalhados na Tabela 2:

Reagente/Material	Descrição	Intervalo de concentração	Código	Quantidade
<i>HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum</i> reaction tube	Lioprotetores e estabilizadores	±6 g/100 mL*	Folha 1E	2 envelopes de 12 tubos transparentes
	Desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP)	±1 mM*		
	Oligonucleótidos e sondas	0,2-1 nMol/µL*		
	Enzimas	10-100 U/reação*		
Rehydration Buffer tube	Mistura de solução salina	±13 mM	Selo 11	1 envelope de 24 tubos transparentes
	Tampões (TRIS, pH)	±67 mM		

Tabela 2. Reagentes e materiais fornecidos no VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System com Cat. N.º 444222.

* Para componente em formato estabilizado, o intervalo de concentração indica o intervalo após reidratação.

5. Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos

A seguinte lista inclui os materiais que são necessários para a utilização, mas que não estão incluídos no VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

- Equipamento de PCR em tempo real: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref: 442827 ou 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vórtex.
- Micropipetas (entre 2 e 1000 µL).
- Água sem nuclease.
- Pontas com filtro.
- Luvas descartáveis sem pó.

Opcional:

- Os materiais de controlo externos podem ser utilizados como parte do procedimento de controlo de qualidade do desempenho do ensaio. Podem ser utilizados como controlo positivo externo (EPC) ou controlo negativo externo (ENC), respetivamente, materiais de controlo disponíveis no mercado e/ou amostras previamente caracterizadas

como positivas ou negativas. A seleção e validação do EPC e do ENC devem ser feitas de acordo com os regulamentos locais, estaduais e/ou federais aplicáveis e com os procedimentos padrão de controlo de qualidade do laboratório. Além disso, ao utilizar materiais de controlo disponíveis no mercado, o utilizador deve seguir as respetivas instruções de utilização.

6. Condições de transporte, armazenamento e utilização

- Os kits podem ser transportados e armazenados entre 2 a 30 °C até à data de validade indicada na etiqueta do kit.
- Evitar vibrações durante o transporte, de modo a prevenir fugas de líquido.
- Após a abertura dos envelopes de alumínio que contêm os tubos de reação, o produto pode ser utilizado até 28 dias a 2-30 °C. Manter o frasco afastado da luz.

A tabela seguinte resume as condições de transporte, armazenamento e utilização do kit no geral e de cada componente:

Componente	Condições de transporte	Condições de armazenamento	Condições em utilização
Kit completo VIASURE HSV-1, HSV-2 & <i>Treponema pallidum</i> Assay for BD MAX™ System		Antes da utilização: 2-30 °C durante o prazo de validade indicado na etiqueta do kit.	* Consultar as condições durante a utilização de cada componente.
HSV-1, HSV-2 & <i>Treponema pallidum</i> reaction tube (folha 1E)	2-30 °C durante o prazo de validade indicado na etiqueta do kit.	Antes da utilização: 2-30 °C durante o prazo de validade indicado na etiqueta do kit. Uma vez aberto o envelope com o gel de sílica: 2-30 °C por um período máximo de 28 dias.	Temperatura ambiente.
Rehydration Buffer tube		Antes da utilização: 2-30 °C durante o prazo de validade indicado na etiqueta do kit. Uma vez aberto o envelope com o gel de sílica: 2-30 °C por um período máximo de 28 dias.	Temperatura ambiente.

Tabela 3. Resumo das condições de transporte, armazenamento e utilização do produto VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System e de cada componente.

7. Precauções para o utilizador

- O produto destina-se a ser utilizado por pessoal de laboratório qualificado e com formação, especificamente instruído e treinado nas técnicas de PCR em tempo real e procedimentos de diagnóstico *in vitro*.
- Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- As instruções de utilização do produto VIASURE e o Manual do utilizador do sistema BD MAX™ devem ser lidos atentamente antes da utilização do VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Não realizar o ensaio antes de terem sido compreendidas as informações sobre procedimentos, precauções de segurança e limitações descritas neste documento.
- Não é recomendado utilizar o kit após a data de validade.
- Não utilizar o kit se a etiqueta de controlo da caixa exterior estiver rasgada ou danificada.
- Não utilizar os reagentes se o estojo exterior estiver aberto ou danificado aquando da receção.
- Não utilizar os reagentes se os envelopes ou os sacos que protegem os tubos estiverem abertos ou danificados aquando da receção.

- Não utilizar os tubos de reação se o material dessecante incluído em cada envelope de alumínio não existir ou estiver danificado.
- Não remover o material dessecante dos envelopes de alumínio.
- Não utilizar os tubos de reagentes se o alumínio protetor estiver rasgado ou danificado.
- Não misturar reagentes de diferentes envelopes e/ou kits e/ou lotes.
- Fechar os envelopes de alumínio que protegem os reagentes com o fecho hermético imediatamente depois de cada utilização, de modo a proteger a mistura principal da luz solar. Antes de fechar os envelopes, eliminar qualquer excesso de ar.
- Proteger os reagentes da humidade. Uma exposição prolongada à humidade pode afetar o desempenho do produto.
- Para evitar a deterioração da etiqueta, não utilizar o produto perto de solventes.
- O aparecimento da mistura de reação num formato estabilizado, normalmente depositada no fundo do tubo, diferente do habitual (sem um formato cónico, não homogénea, de tamanho menor/maior e/ou uma cor diferente de esbranquiçado) não altera a funcionalidade do ensaio.
- Assegurar que o tubo de reação e o tubo de tampão de rehidratação ficam bem encaixados durante a preparação do suporte para tubos do BD MAX™ System.
- No caso de outros ensaios de PCR serem realizados dentro da mesma área geral do laboratório, deve ter-se o cuidado de assegurar que o VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, o kit de extração BD MAX™ ExK™ TNA-3 ou quaisquer outros reagentes adicionais que sejam necessários para realizar os ensaios e o sistema BD MAX™ não estão contaminados. Evitar sempre a contaminação microbiana e por ribonuclease (RNase)/desoxirribonuclease (DNase) dos reagentes. Recomenda-se a utilização de pontas de pipeta estéreis, descartáveis, sem RNase/DNase, resistentes a aerossóis ou de deslocamento positivo. Utilizar uma ponta nova para cada espécime. É necessário mudar de luvas antes da manipulação dos reagentes e dos cartuchos (BD MAX™ PCR Cartridge).
- De modo a evitar a contaminação do ambiente por amplicões, não quebrar o BD MAX™ PCR Cartridge após a utilização. Os selos do BD MAX™ PCR Cartridge foram concebidos para evitar a contaminação.
- Conceber um fluxo de trabalho unidirecional. Deve-se começar na área de extração e, em seguida, passar para a área de amplificação e de deteção. Não colocar as amostras, os equipamentos e os reagentes utilizados em contacto com a área onde foi realizado o passo anterior.
- Seguir as boas práticas do laboratório. Utilizar vestuário de proteção, luvas descartáveis, óculos e máscara. Não comer, beber, fumar ou aplicar produtos de cosmética na área de trabalho. Lavar as mãos após terminar o ensaio.
- As amostras devem ser tratadas como potencialmente infeciosas e/ou com risco biológico, bem como todos os reagentes e materiais que tenham sido expostos às amostras, e devem ser manuseados de acordo com os regulamentos de segurança nacionais. Tomar as precauções necessárias durante a colheita, transporte, armazenamento, tratamento e eliminação de amostras.
- As amostras e reagentes têm de ser manuseados numa câmara de segurança biológica. Utilizar equipamento de proteção individual (EPI) consistente com as orientações atuais para o manuseamento de amostras potencialmente infeciosas. Eliminar os resíduos em conformidade com os regulamentos locais e nacionais.

- Recomenda-se a descontaminação periódica dos equipamentos utilizados habitualmente, em especial de micropipetas e das superfícies de trabalho.
- Em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (REACH), os ensaios VIASURE para o sistema BD MAX™ não requerem Fichas de dados de segurança devido à sua classificação como não perigosos para a saúde e o ambiente, porque não contêm substâncias e/ou misturas que cumpram os critérios de classificação de perigos disponíveis no Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (CLP), ou que estejam presentes em concentrações superiores ao valor estabelecido no regulamento mencionado para a sua declaração. Pode ser solicitada uma declaração à Certest Biotec S.L. indicando que não existe o requisito de Ficha de dados de segurança.
- Assegurar que a definição do programa de ensaio de PCR no BD MAX™ System é feita seguindo as instruções da secção “Protocolo de PCR” (parâmetros de extração de amostras, códigos de barras personalizados, definições de PCR, etc.).
- Consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System para obter informações sobre advertências, precauções e procedimentos adicionais.
- O certificado de análise não é fornecido juntamente com o dispositivo; no entanto, pode ser transferido a partir do website da Certest Biotec S.L. (www.certest.es) em caso de necessidade.

8. Procedimento do ensaio

8.1. Colheita, transporte e conservação de amostras

O VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System foi testado em amostras de esfregaços de lesões cutâneas anogenitais e orais recolhidas utilizando o Copan ESwab® (Copan's Liquid Amies Elution Swab) (doravante, amostras naturais de lesões cutâneas). Outros tipos de amostras têm de ser validados pelo utilizador.

A colheita, conservação e transporte de espécimes devem ser realizados segundo as condições validadas pelo utilizador. No geral, as amostras clínicas devem ser colhidas e etiquetadas adequadamente em recipientes limpos com ou sem meio de transporte (dependendo do tipo de amostra). Após a colheita, os espécimes devem ser colocados num saco para materiais com risco biológico e devem ser transportados e processados assim que possível, de modo a garantir a qualidade do ensaio. As amostras devem ser transportadas à temperatura ambiente (TA) ou a $2\pm2^{\circ}\text{C}$ durante um período máximo de 48 horas, em conformidade com os regulamentos locais e nacionais para o transporte de material patogénico. Para transportes de longa duração, recomenda-se o envio a uma temperatura de -20°C ou inferior². Os espécimes submetidos a ensaios moleculares têm de ser conservados em condições controladas, de modo a que os ácidos nucleicos não se degradem durante a conservação. Recomenda-se a utilização de amostras recentes para o ensaio, mas no caso de não ser possível ou no caso de um estudo retrospectivo, as amostras devem ser conservadas preferencialmente a -70 ou -80°C e, como segunda opção, a -20°C ³.

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

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

Os espécimes clínicos têm de ser colhidos transportados e armazenados de acordo com orientações laboratoriais e/ou manuais de políticas de laboratório apropriados. Como exemplo, consultar o guia da IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94) ou Sánchez-Romero, M. I., García-Lechuz Moya, J. M., González López, J. J. & Orta Mira, N. Collection, transport and general processing of clinical specimens in Microbiology laboratory. *Enfermedades Infect. y Microbiol. Clin.* (English ed.) 37, 127–134 (2019).

Nota: As condições de recolha, transporte e conservação de amostras indicadas acima são sugeridas com base nas recomendações para amostras do trato geniturinário destinadas à deteção de ácidos nucleicos, tal como apresentadas nos guias de referência anteriormente mencionadas. No entanto, recomendamos que siga as diretrizes do laboratório e/ou o manual de políticas de laboratório para o transporte e conservação apropriados das amostras.

Foi realizado um estudo interno de estabilidade de amostras com o VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System utilizando uma matriz natural negativa de lesão cutânea contaminada com herpesvírus humano 1, estirpe KOS (ATCC® VR-1493 Ref. FR-310 (IRR)), vírus de herpes simples tipo 2, estirpe MS (Ref. 0810006CF, Zepotmetrix) e *Treponema pallidum*, estirpe SS14 (Washington University) em concentração de 3xLoD. A estabilidade foi analisada através de três ensaios diferentes: estabilidade primária da amostra aninhada com estabilidade no SBT a 2 ± 2 °C e 25 ± 2 °C, estabilidade da amostra primária a -20 ± 2 °C e ciclos de congelação (-80 °C) - descongelação (25 °C). Os resultados mostraram um bom desempenho das amostras conservadas em todas as condições testadas. Em conclusão, no que diz respeito à estabilidade das amostras primárias, as amostras de lesões cutâneas naturais são estáveis após 48 horas a 2 ± 2 °C e 25 ± 2 °C. No que diz respeito à estabilidade no SBT, as amostras são estáveis após 7 dias no SBT a 2 ± 2 °C e 25 ± 2 °C (tendo permanecido até 48 h a 2 ± 2 °C e 25 ± 2 °C antes da adição ao SBT). Além disso, as amostras são estáveis após 6 meses de conservação a -20 ± 2 °C e durante, pelo menos, 5 ciclos de congelação-descongelação.

8.2. Preparação da amostra e extração de DNA

Realizar a preparação das amostras de acordo com as recomendações nas instruções de utilização do kit de extração utilizado, BD MAX™ ExK™ TNA-3.

1. Pipetar 500 µL de amostra para um tubo com tampão de amostra BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube e fechar o tubo com uma tampa septada. Assegurar uma mistura completa centrifugando a amostra durante 1 minuto a alta velocidade. Prosseguir com o BD MAX™ System Operation.

Nota: Certifique-se de que a agitação em vórtex é realizada alguns minutos antes de iniciar a execução. Se for utilizado o mesmo tubo BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube para repetir o ensaio, recomenda-se agitar manualmente o tubo durante alguns minutos antes de iniciar o ensaio, para garantir a homogeneização adequada da amostra.

Ter em atenção que os procedimentos de preparação para a extração específica da aplicação devem ser desenvolvidos e validados pelo utilizador e que algumas outras amostras podem requerer pré-processamento.

8.3. Protocolo de PCR

Nota: Consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System para obter instruções mais detalhadas.

8.3.1. Programação do ensaio de PCR para o VIASURE HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum Assay for BD MAX™ System

Nota: Se já tiver criado o ensaio para o VIASURE HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum Assay for BD MAX™ System, pode ignorar o passo 8.3.1 e avançar diretamente para o passo 8.3.2.

- 1) No ecrã “Run” (Executar) do BD MAX™ System, selecionar o separador “Test Editor” (Editor de ensaios).
- 2) Clicar no botão “Create” (Criar).

No separador “Basic Information” (Informações básicas):

- 3) No campo “Test Name” (Nome do ensaio), escrever o nome do ensaio: por ex., VIASURE HHT.
Nota: O nome do ensaio tem de ser único e pode ter um máximo de vinte caracteres.
- 4) No menu de lista pendente “Extraction Type” (Tipo de extração), selecionar “ExK TNA-3”.
- 5) No menu de lista pendente “Master Mix Format” (Formato de mistura principal), escolher “Type 5: Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer” (Tipo 5: MP liofilizada concentrada com tampão de reidratação).
- 6) No campo “Sample Extraction Parameters” (Parâmetros de extração da amostra), selecionar “User Defined” (Definidos pelo utilizador) e ajustar os valores dos seguintes parâmetros (Tabela 4).

<i>Sample Extraction Parameters</i> (Parâmetros de extração da amostra)	Value (units) (Valor (unidades))
<i>Lysis Heat Time</i> (Tempo de lise por calor)	15 (min)
<i>Lysis Temperature</i> (Temperatura de lise)	55 (°C)
<i>Sample Tip Height</i> (Altura de ponta da amostra)	1600 (passos)
<i>Sample Volume</i> (Volume da amostra)	475 (µL)
<i>Wash Volume</i> (Volume de lavagem)	500 (µL)
<i>Neutralization Volume</i> (Volume de neutralização)	N/A
<i>DNase Heat Time</i> (Tempo de aquecimento de DNase)	N/A

Tabela 4. Parâmetros de extração de amostras realizada com o BD MAX™ ExK™ TNA-3.

- 7) No campo “Ct Calculation” (Cálculo Ct) selecionar “Call Ct at Threshold Crossing” (Ativar Ct aquando do cruzamento do limite) (selecionado por definição).
- 8) Se estiver a ser utilizada a versão 5.00 do software ou uma versão posterior e estiverem a ser utilizados tubos de encaixe com selo e código de barras, no campo “Custom Barcodes” (Personalizar códigos de barra) selecionar a configuração seguinte:
 - a. “Snap-In 2 Barcode” (Código de barras da posição de encaixe 2): 1E (em relação ao HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum reaction tube).

- b. “Snap-In 3 Barcode” (Código de barras da posição de encaixe 3): 11 (relativamente ao Rehydration Buffer tube).

No separador “PCR Settings” (Definições de PCR):

- 9) No campo “PCR Settings” (Definições de PCR), introduzir os seguintes parâmetros descritos na Tabela 5: “Alias” (até sete caracteres alfanuméricos), “PCR Gain” (Ganho de PCR), “Threshold” (Limite), “Ct Min” (Ct Mín.) e “Ct Max” (Ct Máx.).

Channel (Canal)	Alias (Alias)	PCR Gain (Ganho de PCR)	Threshold (Limite)	Ct Min (Ct Mín.)	Ct Max (Ct Máx.)
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. PCR settings (Definições de PCR).

Nota: Recomenda-se o estabelecimento dos valores-limite mínimos acima indicados para cada canal como valores de partida, mas os valores finais têm de ser determinados pelo utilizador final durante a interpretação do resultado, de modo a assegurar que os limites estão dentro da fase exponencial das curvas de fluorescência e acima de qualquer sinal de fundo. O valor-limite para diferentes instrumentos pode variar devido a diferentes intensidades do sinal.

- 10) No campo “Color compensation” (Compensação de cor), introduzir os seguintes parâmetros (Tabela 6).

Channel (Canal)	False Receiving Channel (Canal recetor falso)				
	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal de excitação)	475/520	-	4	0	0
	530/565	0	-	0	0
	585/630	0	0	-	4
	630/665	0	0	0	-
	680/715	0	0	0	-

Tabela 6. Parâmetros de “Compensação de cor”.

No separador “Melt Settings” (Definições de fusão) não é necessária qualquer ação, não é aplicável a este produto.

No separador “Test Steps” (Etapas do ensaio):

- 11) Introduzir o nome da etapa (até vinte caracteres) e programar os seguintes parâmetros para definir cada etapa do protocolo de PCR: “Profile Type” (Tipo de perfil), “Cycles” (Ciclos), “Time” (Tempo) e “Temperature” (Temperatura) e selecionar o campo “Detect” (Detetar) para definir a etapa de deteção (Tabela 7). Clicar no botão “Add” (Adicionar) para adicionar um novo passo e repetir até serem definidos todos os passos necessários.

Nota: O campo “Type” (Tipo) tem de estar vazio.

Step (Passo)	Step name (Nome do passo)	Profile Type (Tipo de perfil)	Cycles (Ciclos)	Time (s) (Tempo(s))	Temperature (Temperatura)	Detect (Detetar)
Initial denaturation (Desnaturação inicial)	IN-denaturation	Hold	1	120	98 °C	-
Desnaturação e hibridização/Extensão (recolha de dados)	Annealing/Extension	2-Temperature	45	10	95 °C	-
				41	63 °C	✓

Tabela 7. Protocolo de PCR.

No separador “Result Logic” (Lógica de resultados):

- 12) No campo “Target” (Alvo), atribuir um nome ao seu alvo: ou seja, HSV1 (até sete caracteres alfanuméricicos). Repetir os passos 12-15 para cada alvo (ou seja, HSV2 ou TRE) seguindo as tabelas específicas para o alvo que está a ser definido.
- 13) Clicar na caixa de verificação “Analyze” (Analizar) para incluir os comprimentos de onda desejados (canais de PCR) na análise de resultados do alvo (Tabelas 8-10).

Wavelength (Comprimento de onda)	Alias (Alias)	Type (Tipo)	Analyze (Analizar)
475/520	HSV1	PCR	✓
585/630	EIC	PCR	✓

Tabela 8. Seleção dos canais de PCR no separador “Result logic” (Lógica de resultados) para o alvo HSV1 (vírus de herpes simples 1).

Wavelength (Comprimento de onda)	Alias (Alias)	Type (Tipo)	Analyze (Analizar)
530/565	HSV2	PCR	✓
585/630	EIC	PCR	✓

Tabela 9. Seleção dos canais de PCR no separador “Result logic” (Lógica de resultados) para o alvo HSV2 (vírus de herpes simples 2).

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

Tabela 10. Seleção dos canais de PCR no separador “Result logic” (Lógica de resultados) para o alvo TRE (*Treponema pallidum*).

- 14) Clicar no botão “Edit Logic” (Editar lógica).
- 15) Na janela “Edit Logic” (Editar lógica), são listadas todas as combinações de tipos de resultados. Para cada linha, no menu pendente “Result” (Resultado), selecionar o resultado que é chamado quando se cumprem as condições dessa linha, seguindo as Tabelas 11-13.

Result (Resultado)	HSV1 (475/520)	EIC (585/630)
POS	Valid (Válido)	Valid (Válido)
UNR	Valid (Válido)	Invalid (Inválido)
NEG	Invalid (Inválido)	Valid (Válido)
UNR	Invalid (Inválido)	Invalid (Inválido)

Tabela 11. Lista da combinação de tipos de resultados e lógica de resultados para o alvo HSV1 (vírus de herpes simples 1). Os resultados disponíveis são POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Não resolvido).

Result (Resultado)	HSV2 (530/565)	EIC (585/630)
POS	Valid (Válido)	Valid (Válido)
UNR	Valid (Válido)	Invalid (Inválido)
NEG	Invalid (Inválido)	Valid (Válido)
UNR	Invalid (Inválido)	Invalid (Inválido)

Tabela 12. Lista da combinação de tipos de resultados e lógica de resultados para o alvo HSV2 (vírus de herpes simples 2). Os resultados disponíveis são POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Não resolvido).

Result (Resultado)	TRE (630/665)	EIC (585/630)
POS	Valid (Válido)	Valid (Válido)
UNR	Valid (Válido)	Invalid (Inválido)
NEG	Invalid (Inválido)	Valid (Válido)
UNR	Invalid (Inválido)	Invalid (Inválido)

Tabela 13. Lista da combinação de tipos de resultados e lógica de resultados para o alvo TRE (*Treponema pallidum*). Os resultados disponíveis são POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Não resolvido).

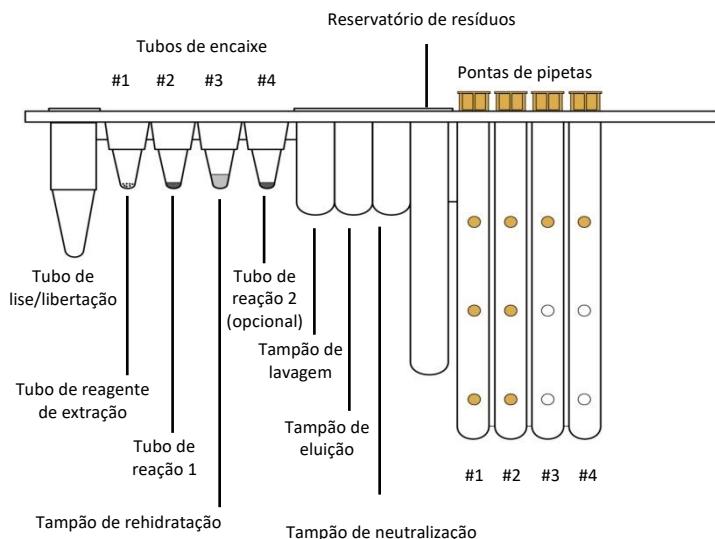
Nota: De acordo com o Ct Max definido anteriormente (Tabela 5), o resultado dos canais HSV1 (475/520), HSV2 (530/565), EIC (585/630) e TRE (630/665) é considerado “Valid” (Válido) quando o valor de Ct obtido é ≤ 40 ; e “Invalid” (Inválido) quando o valor de Ct obtido é > 40 .

- 16) Clicar no botão “Save” (Guardar) para guardar o ensaio.

8.3.2. Preparação do suporte para tubos do BD MAX™ System

- 1) Para cada amostra a testar, retirar uma tira de reagentes individual (Unitized Reagent Strips) do BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Bater levemente cada tira sobre uma superfície dura para se certificar de que todos os líquidos se encontram no fundo dos tubos e colocar a tira de reagentes no suporte para tubos do BD MAX™ System.
- 2) Determinar e separar o número de tubos de reagente de extração necessários (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (selo branco)) da sua bolsa protetora. Colocar o(s) tubo(s) de reagente de extração (selo branco) na sua posição correspondente dentro da tira de reagentes TNA (Posição 1, código de cor branca no suporte para tubos. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar as bolsas protetoras com o fecho hermético.
- 3) Determine e separe o número apropriado de *HSV-1*, *HSV-2* & *Treponema pallidum* reaction tubes (folha 1E) e encaixe-os nas posições correspondentes na tira (posição de encaixe 2, código de cor verde no rack. Ver Figura 1).
 - a. Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes de alumínio com o fecho hermético.
 - b. Para uma reidratação correta, deve certificar-se de que o produto liofilizado está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou ao vedante de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o produto se encontra no fundo do tubo.
- 4) Remover o número necessário de Rehydration Buffer Tubes (selo 11) e colocá-los nas posições correspondentes na tira (Posição de encaixe 3, código sem cor no suporte para tubos. Ver Figura 1).
 - a. Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes com o fecho hermético.
 - b. De modo a assegurar uma transferência correta, deve certificar-se de que o líquido está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou ao vedante de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o tampão se encontra no fundo do tubo.

Figura 1. Tira de BD MAX™ TNA Reagent (TNA) do kit BD MAX™ ExK™ TNA-3.



8.3.3. Configuração do instrumento BD MAX™

- 1) Selecionar o separador “Worklist” (Lista de trabalho) no ecrã “Run” (Executar) utilizando o software v4.50A ou superior do BD MAX™ System.
- 2) No menu de lista pendente “Test” (Ensaio), selecionar o ensaio pretendido, ou seja, VIASURE HHT (se ainda não tiver sido criado, consultar a secção 8.3.1).
- 3) No menu pendente “Kit Lot Number” (N.º de lote do kit), selecionar o número de lote apropriado para o kit (encontra-se na caixa exterior do kit de extração utilizado) (opcional).

Nota: Os números de lote têm de ser definidos no separador “Inventory” (Inventário) antes de poderem ser selecionados aqui.
- 4) Introduzir o número de identificação do Sample Buffer Tube no campo “Sample tube” (Tubo de amostra), quer através da digitalização do código de barras com o leitor ou através de entrada manual.
- 5) Preencher o campo “Patient ID” (ID do doente) e/ou “Accession” (Acesso) e clicar na tecla Tab ou Enter. Continuar até estarem introduzidos todos os códigos de barras dos Sample Buffer Tubes. Certificar-se de que a identificação do espécime/doente e dos Sample Buffer Tubes estão corretamente equiparados.
- 6) Colocar o Sample Buffer Tube preparado no(s) suportes BD MAX™.
- 7) Colocar o(s) suporte(s) no BD MAX™ System (o suporte para tubos A encontra-se no lado esquerdo do BD MAX™ System e o suporte para tubos B no lado direito).
- 8) Colocar o número necessário de BD MAX™ PCR Cartridge no BD MAX™ System.
- 9) Fechar a porta do BD MAX™ System.
- 10) Clicar em “Start” (Iniciar) para iniciar o procedimento.

8.3.4. Relatório de resultados do BD MAX™

- 1) Na barra de menus, clicar no botão “Results” (Resultados).
- 2) Clicar duas vezes no ensaio incluído na lista de ensaios ou premir o botão “View” (Visualizar).
- 3) Os botões “Print” (Imprimir) e “Export” (Exportar) na parte inferior do ecrã serão ativados.

Para imprimir os resultados:

1. Clicar no botão “Print” (Imprimir).
2. Na janela de pré-visualização “Print” (Imprimir) do relatório de execução, selecionar: “Run Details” (Detalhes da execução), “Test Details” (Detalhes do ensaio) e “Plots” (Gráficos).
3. Clicar em “Print” (Imprimir) para imprimir o relatório ou clicar em “Export” (Exportar) para exportar um PDF do relatório para uma pen USB.

Para exportar os resultados:

1. Clicar no botão “Export” (Exportar) para transferir o relatório (ficheiro PDF e CSV) para uma pen USB.
2. Quando a exportação estiver concluída, o ícone de sucesso/falha aparece na janela “Results Export” (Exportação de resultados).

9. Interpretação dos resultados

Para uma descrição detalhada de como analisar os dados, consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System.

A análise dos dados é realizada com o software BD MAX™ de acordo com as instruções de utilização do fabricante. O software do BD MAX™ System disponibiliza os valores de Ct e mostra as curvas de amplificação para cada um dos canais de deteção de cada amostra analisada da seguinte forma:

- Um valor de Ct de 0 indica que o software não calculou nenhum valor de Ct com o limiar especificado (consultar a Tabela 5). Se a curva de amplificação mostra um “0” como valor de Ct, é necessário analisá-la manualmente.
- Um valor de Ct igual a -1 indica que não ocorreu nenhum processo de amplificação, que não foi calculado nenhum valor de Ct pelo software ou que o valor de Ct calculado está abaixo do limite especificado ou acima do Ct Máx. estabelecido (valor-limite).
- Qualquer outro valor de Ct deve ser interpretado em correlação com a curva de amplificação e de acordo com a lógica de resultados definida, segundo as orientações de interpretação descritas na Tabela 14.

Verificar a emissão do sinal do Controlo Interno Endógeno (EIC) para confirmar o funcionamento correto da mistura de amplificação. Para além disso, verificar se não há nenhum relatório de anomalia do BD MAX™ System.

Os resultados devem ser lidos e analisados utilizando a tabela seguinte:

HSV-1 (nome do alvo: HSV1)	HSV-2 (nome do alvo: HSV2)	<i>T. pallidum</i> (nome do alvo: TRE)	Interpretação de amostras individuais do doente
POS	POS	POS	DNA de HSV-1, HSV-2 e <i>Treponema pallidum</i> detetado.
POS	POS	NEG	DNA de HSV-1 e HSV-2 detetado. DNA de <i>Treponema pallidum</i> não detetado.
POS	NEG	POS	DNA DE HSV-1 e <i>Treponema pallidum</i> detetado. DNA de HSV-2 não detetado.
NEG	POS	POS	DNA de HSV-2 e <i>Treponema pallidum</i> detetado. DNA de HSV-1 não detetado.
POS	NEG	NEG	DNA de HSV-1 detetado. DNA de HSV-2 e <i>Treponema pallidum</i> não detetado.
NEG	POS	NEG	DNA de HSV-2 detetado. DNA de HSV-1 e <i>Treponema pallidum</i> não detetado.
NEG	NEG	POS	DNA de <i>Treponema pallidum</i> detetado. DNA de HSV-1 e HSV-2 não detetado.
NEG	NEG	NEG	DNA de HSV-1, HSV-2 e <i>Treponema pallidum</i> não detetado.
UNR	UNR	UNR	Resultado não resolvido (UNR) obtido na presença de inibidores na reação de PCR ou quando ocorre um problema geral (não indicado por um código de erro) nos passos de processamento e/ou amplificação da amostra. ¹
IND	IND	IND	Resultado indeterminado do ensaio (IND). Devido a anomalia do BD MAX™ System. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha do instrumento associado a um código de erro. ²

INC	INC	INC	Resultado incompleto do ensaio (INC). Devido a anomalia do BD MAX™ System. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha de uma execução completa.²
-----	-----	-----	--

Tabela 14. Interpretação da amostra.

1 O Controlo Interno Endógeno (EIC) deve apresentar um sinal de amplificação com valor de $Ct \leq 40$ para ser considerado. Se houver ausência de sinal para o EIC ou o valor de Ct for >40 , o resultado é considerado Não Resolvido (UNR) e é necessário repetir o ensaio. Recomenda-se a repetição do ensaio a partir do mesmo tubo Sample Buffer Tube (SBT), a partir da mesma amostra, preparando um novo SBT ou a partir de uma nova amostra (mais concentrada, se possível). Também pode acontecer que o resultado Não Resolvido (UNR) se deve à presença de inibidores na reação de PCR. Nestes casos, recomenda-se diluir estas amostras 1/10.

NOTA: as amostras naturais de lesões cutâneas podem ser mantidas sem transferência para o SBT durante um período máximo de 48 horas se forem armazenadas a $2\pm 2^{\circ}\text{C}$ - $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (expresso em ESwab® da Copan). No caso de repetir o ensaio a partir do mesmo SBT, recomenda-se agitar manualmente o SBT para garantir a homogeneização adequada da amostra. Tenha em atenção que as amostras naturais de lesões cutâneas podem ser mantidas no SBT durante um período máximo de 7 dias a $2\pm 2^{\circ}\text{C}$ - $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

2 Podem ser obtidos resultados Indeterminados (IND) ou Incompletos (INC) devido a uma falha do sistema e é necessário repetir o ensaio. Consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System para a interpretação dos códigos de aviso e de erro.

Nota: Quando utilizar controlos externos, estes devem produzir os seguintes resultados esperados: negativos para o ENC e positivos para o EPC (espera-se que os espécimes positivos conhecidos sejam positivos apenas para os microrganismos presentes no espécime). Um ENC que produza um resultado de ensaio positivo indica um evento de contaminação ou falha no manuseamento do espécime. Um EPC que produza um resultado negativo indica um problema de manuseamento/preparação do espécime. Rever a técnica de manuseamento/preparação do espécime. Quando ocorre uma falha de controlo externo, é necessário repetir o ensaio.

Em caso de um resultado ambíguo contínuo, é recomendável reler as instruções de utilização, o processo de extração usado pelo utilizador; para verificar o desempenho correto de cada passo da PCR e rever os parâmetros e para verificar a forma sigmoideia da curva e a intensidade da fluorescência.

Os resultados do ensaio devem ser avaliados por um profissional de saúde no contexto da história clínica, sintomas clínicos e outros ensaios diagnósticos.

10. Limitações do ensaio

- Os resultados do ensaio devem ser avaliados por um profissional de saúde no contexto da história clínica, sintomas clínicos e outros ensaios diagnósticos.
- Embora este ensaio possa ser utilizado com outros tipos de amostras, foi validado apenas com amostras de esfregaços de lesões cutâneas anogenitais e orais.
- Para o bom desempenho do ensaio, o produto liofilizado deve estar no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou ao vedante de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o produto se encontra no fundo do tubo.
- É possível que seja observada interferência em canais vazios do BD MAX™ System caso não exista alvo a ser detetado, pelo que é necessário selecionar apenas os canais onde os alvos estejam amplificados ao realizar a interpretação dos resultados. Contacte viaresupport@certest.es para eventuais pedidos de esclarecimentos.

- A qualidade do ensaio depende da qualidade da amostra; o ácido nucleico tem de ser corretamente extraído das amostras clínicas.
- O ensaio é um ensaio qualitativo e não fornece valores quantitativos, nem indica o número de organismos presentes. Não é possível correlacionar os valores de Ct obtidos por PCR com a concentração da amostra, pois esses valores dependem do termociclador utilizado e do próprio ensaio.
- Podem ser detetados níveis extremamente baixos de alvos abaixo do limite de deteção, mas os resultados podem não ser reproduzíveis.
- Ter em atenção o intervalo de medição previsto do ensaio, pois amostras com concentrações acima ou abaixo deste intervalo podem apresentar resultados erróneos.
- Existe a possibilidade de resultados falsos positivos devido à contaminação cruzada por HSV-1, HSV-2 e/ou *T. pallidum* em amostras contendo elevadas concentrações de DNA-alvo ou contaminação devido a produtos de PCR de reações anteriores.
- As combinações de oligonucleótidos e sondas específicas para a deteção do gene *UL1 da glicoproteína L* do HSV-1, do gene *US4 da glicoproteína G* do HSV-2 e do gene *16S rRNA* do *T. pallidum*, utilizadas no VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, não apresentam homologias combinadas significativas com o genoma humano, a microflora humana ou outros microrganismos, que possam resultar em falsos positivos previsíveis.
- Resultados falsos negativos podem ser causados por vários fatores e respetivas combinações, incluindo:
 - Métodos incorretos de colheita, transporte, armazenamento e/ou manuseamento de espécimes.
 - Procedimentos de processamento incorretos (incluindo extração de DNA).
 - Degradação do DNA durante a expedição/armazenamento e/ou processamento das amostras.
 - Mutações ou polimorfismos em regiões de ligação de oligonucleótidos ou sondas podem afetar a deteção de novas ou desconhecidas de estirpes de HSV-1, HSV-2 e/ou *T. pallidum*.
 - Uma carga microbiana na amostra abaixo do limite de deteção para o ensaio.
 - A presença de inibidores de qPCR ou de outros tipos de substâncias interferentes. Não foram avaliados os efeitos de vacinas, algumas terapêuticas antivirais, antibióticos, fármacos quimioterapêuticos ou imunossupressores, ou de antifúngicos utilizados para prevenir infecções ou utilizados durante o tratamento da infecção.
 - O efeito de substâncias interferentes apenas foi avaliado para as indicadas na secção 12.5.1 (estudo de substâncias interferentes) destas instruções de utilização. Consultar esta secção para obter informações sobre as substâncias endógenas e exógenas mais comuns que induzem interferência total ou parcial na reação de qPCR. Outras substâncias não indicadas nesta parte podem conduzir a resultados erróneos.
 - A não observância das instruções de utilização e do procedimento do ensaio.
- Um resultado de ensaio positivo não indica necessariamente a presença de microrganismos viáveis e não significa que estes microrganismos são infeciosos ou que são os agentes causadores de sintomas clínicos. No entanto, um resultado positivo é indicativo da presença de sequências-alvo HSV-1, HSV-2 e/ou *T. pallidum*.
- Resultados negativos não excluem a presença de DNA de HSV-1, HSV-2 e/ou *T. pallidum* numa amostra clínica e não devem ser utilizados como único fundamento para o tratamento ou outras decisões de gestão do doente. Não foram determinados os tipos de amostras ideais e o momento em que se alcançam os níveis microbianos máximos durante

as infecções causadas por HSV-1, HSV-2 e/ou *T. pallidum*. Pode ser necessária a colheita de vários espécimes (tipos e pontos temporais) do mesmo doente para detetar o agente patogénico.

- Se os ensaios de diagnóstico para outras doenças sexualmente transmissíveis (DST) forem negativos e as observações clínicas, os antecedentes do doente e as informações epidemiológicas sugerirem a possibilidade de infecção por HSV-1, HSV-2 e/ou *T. pallidum*, então deve considerar-se o resultado como um falso negativo e deve discutir-se a possibilidade de testar novamente o doente.
- Os valores de fluorescência podem variar devido a vários fatores, tais como: equipamento de PCR (mesmo que seja do mesmo modelo), sistema de extração, tipo de amostra, tratamento prévio da amostra, etc., entre outros.
- Os valores preditivos positivos e negativos são altamente dependentes da prevalência em todos os ensaios de diagnóstico *in vitro*. O desempenho do VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System pode variar dependendo da prevalência e da população testada.
- Em caso de obtenção de resultados não resolvidos, indeterminados ou incompletos utilizando o VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, será necessário repetir o ensaio. Os resultados não resolvidos podem dever-se à presença de inibidores na amostra ou a uma reidratação incorreta do tubo de mistura da reação liofilizada. Se ocorrer uma avaria no instrumento, serão obtidos resultados indeterminados ou incompletos.

11. Controlo de qualidade

O VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System contém um Controlo Interno Endógeno (EIC) em cada tubo de reação que confirma o desempenho correto da técnica. Além disso, a utilização de controlos externos (EPC e ENC) permite confirmar o desempenho do ensaio. Os controlos externos não são utilizados pelo BD MAX™ System para fins de interpretação de resultados, mas são considerados como uma amostra. O Controlo Positivo Externo (EPC) destina-se a monitorizar uma possível falha dos reagentes do ensaio, enquanto o Controlo Negativo Externo (ENC) se destina a detetar a contaminação ambiental ou de reagentes por ácidos nucleicos-alvo.

12. Características de desempenho analítico

12.1. Linearidade analítica

A linearidade do ensaio foi determinada e confirmada testando uma série de diluições 1:10 de amostras de matriz artificial de lesão cutânea⁴ (Artificial Matrix for Cutaneous Lesion, Biochemazone BZ394) contendo uma concentração conhecida (variando de 2E+07 a 2E+01 cópias/µL) de DNA específico e sintético pertencente ao HSV-1, HSV-2 e *T. pallidum*. Apresenta-se abaixo um exemplo do gráfico de amplificação resultante de um ensaio:

⁴ Devido à disponibilidade limitada de amostras de esfregaços de lesões cutâneas anogenitais e orais, foi realizado um estudo de equivalência de matriz natural *versus* matriz artificial para confirmar que a matriz artificial pode ser utilizada em ensaios de validação. Portanto, tanto as matrizes naturais como as artificiais foram testadas e confirmadas como equivalentes.

Figura 2. Diluições em série de HSV-1 (2E+07 a 2E+01 cópias/µL). Ensaio realizado no sistema BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

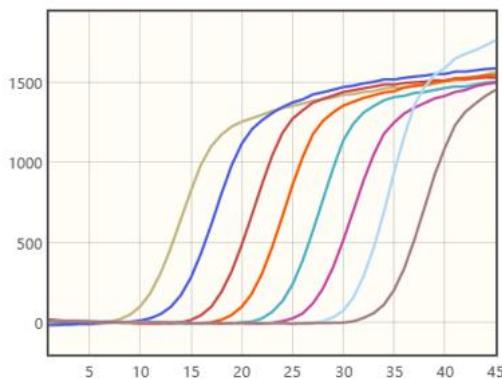


Figura 3. Diluições em série de HSV-2 (2E+07 a 2E+01 cópias/µL). Ensaio realizado no sistema BD MAX™ System (canal 530/565 (HEX)).

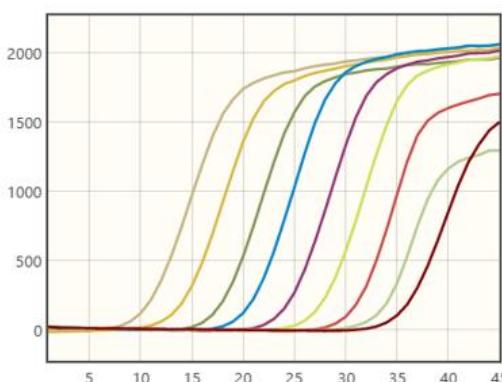
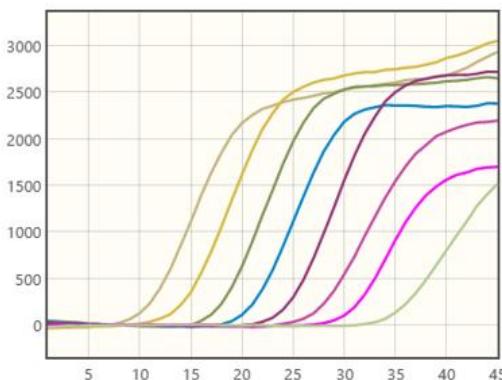


Figura 4. Diluições em série de *T. pallidum* (2E+07 a 2E+01 cópias/µL). Ensaio realizado no sistema BD MAX™ System (canal 630/665 (Cy5)).



12.2. Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica é frequentemente designada por limite de deteção (LoD). Na prática, os parâmetros de LoD e Limite de Branco (LoB) são determinados como parte da avaliação da sensibilidade analítica.

12.2.1. Limite de Branco (LoB)

Para determinar o “limite de branco” (LoB), foi realizado um ensaio de controlo sem modelo utilizando três lotes do VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System e 24 réplicas de três tipos de amostras: amostras naturais negativas de lesão cutânea, matriz artificial de lesão cutânea e Water RNase/DNAse free.

Foi verificada a ausência de sinal nos canais FAM, HEX e Cy5, bem como a presença de sinal para o Controlo Interno Endógeno (EIC) no canal ROX no caso de matriz negativa (matriz de lesão cutânea natural ou simulada). Em conclusão, os resultados obtidos confirmaram que o produto não gera amplificações inespecíficas nas diferentes matrizes testadas.

12.2.2. Limite de deteção (LoD)

O limite de deteção (LoD) do VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System foi analisado com três lotes utilizando amostras de lesão cutânea natural. As estirpes de referência utilizadas foram herpesvírus humano 1, estirpe KOS (ATCC® VR-1493, Ref FR-310 (IRR)), vírus de herpes simples tipo 2, estirpe MS (Ref, 0810006CF (Zeptometrix)) e *Treponema pallidum*, estirpe SS14 (Washington University). Em conclusão, o VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System apresentou um LoD de 2,52E+02 TCID50/mL para o HSV-1, 6,30E+00 TCID50/mL para o HSV-2 e 6,60E+03 células/mL para o *T. pallidum*, com uma taxa positiva de ≥ 95%, em amostras naturais de lesão cutânea.

12.3. Intervalo de medição

O intervalo de medição do ensaio foi determinado testando uma série de diluições 1:10 contendo uma concentração conhecida de ADN específico pertencente ao HSV-1, HSV-2 e *T. pallidum*. Os resultados permitiram confirmar a deteção correta do alvo de 2E+07 para 2E+00 cópias/µL para os alvos HSV-1 e *T. pallidum*, e de 2E+07 para 2E-01 cópias/µL para o alvo HSV-2.

Em conclusão, o intervalo de medição do VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System foi determinado com sucesso, garantindo resultados fiáveis, precisos e reproduzíveis num amplo espetro de cargas virais/bacterianas, o que confirma a sua utilidade em vários cenários de diagnóstico clínico.

12.4. Exatidão

12.4.1. Veracidade

A veracidade do VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System foi avaliada testando o material de referência listado abaixo contaminado com matriz de lesão cutânea.

1. Fragmentos de DNA sintético

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

Todos os fragmentos de DNA sintético foram detetados corretamente no canal adequado.

2. American Type Culture Collection (“ATCC®”)

Referência externa	Microrganismo	Nome do produto	Variedade	Resultado
VR-1493	Vírus do herpes simples do Tipo 1	Human herpesvirus 1	Estirpe KOS	Detetado
VR-260	Vírus do herpes simples do Tipo 1	Human Herpesvirus 1	Estirpe HF	Detetado
VR-539	Vírus do herpes simples do Tipo 1	Human Herpesvirus 1	Estirpe MacIntyre	Detetado
VR-733	Vírus do herpes simples do Tipo 1	Human Herpesvirus 1	Estirpe F	Detetado
VR-3393	Vírus do herpes simples do Tipo 2	Human Herpesvirus 2	Estirpe G	Detetado
VR-1779	Vírus do herpes simples do Tipo 2	Human Herpesvirus 2	Estirpe ATCC-2011-2	Detetado
BAA-2642SD	<i>Treponema pallidum</i>	Quantitative Synthetic <i>Treponema pallidum</i> DNA	N/A	Não detetado

Tabela 15. Material de referência proveniente da American Type Culture Collection (ATCC®).

Todas as estirpes da ATCC foram corretamente detetadas no canal apropriado e o EIC apresentou amplificação com um valor de $Ct \leq 40$, exceto para o Quantitative Synthetic *Treponema pallidum* DNA (código ATCC BAA-2642SD). Este DNA sintético inclui fragmentos dos genes *polA*, *23S*, *16S*, *flaA*, proteína 47kDa e *bmp*, no entanto, a ausência de deteção em concentração muito alta (até 4,70E+04 cópias/ μ L) utilizando o ensaio VIASURE sugere que a sua região-alvo no gene *16S* não está incluída no DNA sintético da ATCC. Portanto, não pode ser utilizado como material de referência.

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

Referência externa	Microrganismo	Nome do produto	Variedade	Resultado
16/368	Vírus do herpes simples do Tipo 1	1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-1 (HSV-1)	N/A	Detetado
17/122	Vírus do herpes simples do Tipo 2	1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-2 (HSV-2)	N/A	Detetado

Tabela 16. Material de referência proveniente do National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC).

Todas as estirpes do NIBSC foram corretamente detetadas no canal adequado e o EIC apresentou amplificação com um valor de $Ct \leq 40$.

4. Material de controlo

Referência externa	Proveniência	Microrganismo	Nome do produto	Variedade	Resultado
0810006CF	ZeptoMetrix	Vírus do herpes simples do Tipo 2	Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2)	Estirpe MS	Detetado
MBC109	Vircell S.L.	<i>Treponema pallidum</i>	AMPLIRUN® TREPONEMA PALLIDUM DNA CONTROL	N/A	Detetado
N/A	University of Washington	<i>Treponema pallidum</i>	Heat-killed <i>Treponema pallidum</i>	Estirpe Nichols	Detetado
N/A	University of Washington	<i>Treponema pallidum</i>	Heat-killed <i>Treponema pallidum</i>	Estirpe SS14	Detetado

Tabela 17. Material de controlo para HSV-2 e *T. pallidum* proveniente de Vircell S.L, ZeptoMetrix e University of Washington.

Todas as estirpes e materiais de referência utilizados foram corretamente detetados no canal apropriado e o EIC apresentou amplificação com um valor $Ct \leq 40$.

12.4.2. Precisão

Para determinar a precisão do VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, foram realizados ensaios intra-ensaio (repetibilidade), inter-ensaio, inter-lote e inter-termociclador (reprodutibilidade) com matriz artificial de lesão cutânea contaminada com as estirpes de referência de herpesvírus humano 1, estirpe KOS (ATCC® VR-1493, Ref. FR-310 (IRR)), vírus de herpes simples tipo 2, estirpe MS (Ref. 0810006CF (Zeptometrix)) e *Treponema pallidum*, estirpe SS14 (Washington University).

Intra-ensaio

O intra-ensaio foi testado analisando seis réplicas de todas as amostras no mesmo ensaio, utilizando o VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. A tabela seguinte apresenta um resumo dos resultados.

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

Tabela 18. Resultados do intra-ensaio do VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = Ciclo-limite. (\bar{x}) = média aritmética do valor Ct, (σ) = desvio padrão, (CV %) = coeficiente de variação, NEG = negativo, N/A = não aplicável.

Inter-ensaio

O inter-ensaio foi testado analisando quatro réplicas das diferentes amostras em três dias diferentes por três operadores diferentes, utilizando o VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. A tabela seguinte apresenta um resumo dos resultados.

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

Tabela 19. Resultados do intra-ensaio do VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = Ciclo-limite. (\bar{x}) = média aritmética do valor Ct, (σ) = desvio padrão, (CV %) = coeficiente de variação, NEG = negativo, N/A = não aplicável.

Inter-lote

Os valores de inter-lote foram determinados com seis réplicas das diferentes amostras utilizando três lotes do VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. A tabela seguinte apresenta um resumo dos resultados.

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

Tabela 20. Resultados do inter-lote do VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = Ciclo-limite. (\bar{x}) = média aritmética do valor Ct, (σ) = desvio padrão, (CV %) = coeficiente de variação, NEG = negativo, N/A = não aplicável.

Inter-termociclador

Os valores de inter-termociclador foram determinados com quatro réplicas das mesmas amostras utilizadas para a avaliação intra-ensaio, inter-ensaio e inter-lote, utilizando o VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System e três sistemas BD MAX™ diferentes. A tabela seguinte apresenta um resumo dos resultados.

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

Tabela 21. Resultados do inter-termociclador do VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (Ct) = Ciclo-limite. (\bar{x}) = média aritmética do valor Ct, (σ) = desvio padrão, (CV %) = coeficiente de variação, NEG = negativo, N/A = não aplicável.

Em conclusão, o estudo de precisão confirmou o desempenho fiável e a consistência do VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

12.4.3. Exatidão

A experiência de precisão foi conduzida através da análise de painéis de programas de avaliação de qualidade externa (EQA). Foram analisadas amostras contendo HSV-1, HSV-2 ou *T. pallidum*, entre outros microrganismos não-alvo. Todos os resultados dos ensaios, apresentados na tabela seguinte, foram comparados com os relatórios finais fornecidos pelos organizadores dos programas EQA.

Alvo	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. Resultados de precisão utilizando o VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. (ORA) = concordância geral, (TP) = verdadeiros positivos, (TN) = verdadeiros negativos, (FP) = falsos positivos, (FN) = falsos negativos, (PPA) = percentagem de concordância positiva, (NPA) = percentagem de concordância negativa.

Em conclusão, o VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System proporciona uma elevada precisão na deteção de DNA de HSV-1, HSV-2 e *T. pallidum*, com excelentes valores de NPA e PPA em todas as estirpes testadas.

12.5. Especificidade e reatividade analítica

A especificidade e a reatividade analítica foram avaliadas para o VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System *in silico* e experimentalmente, utilizando diferentes materiais de partida, tais como estirpes de referência certificadas, RNA/DNA de referência certificados e materiais de programas de avaliação de qualidade externa (EQA).

12.5.1. Especificidade analítica

A especificidade analítica é a capacidade do ensaio para detetar o alvo pretendido. Existem quatro componentes a considerar para a especificidade analítica: a reatividade cruzada, a coinfeção, a interferência de agentes microbianos e a interferência de substâncias. A reatividade cruzada pode ocorrer quando microrganismos geneticamente relacionados estão presentes numa amostra de um doente, enquanto a interferência microbiana pode acontecer se esses microrganismos geneticamente relacionados alterarem a deteção dos microrganismos-alvo quando estão presentes. De forma semelhante, o estudo de coinfeção visa avaliar se os microrganismos-alvo a diferentes concentrações na mesma amostra podem alterar a deteção entre eles. Por último, pode ocorrer interferência de substâncias se a presença de substâncias específicas potencialmente presentes na matriz da amostra afetar o desempenho da qPCR.

Análise in silico da reatividade cruzada

A reatividade cruzada foi avaliada utilizando sequências de referência dos agentes patogénicos do NCBI Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e com ferramentas de alinhamento como a BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e um software de análise bioinformática interno.

Os resultados apresentados mostram apenas sequências com uma percentagem de homologia superior a 80%. As sequências alinhadas com uma percentagem de alinhamento inferior a 80% de homologia foram consideradas improváveis de serem detetadas.

Treponema pallidum

Todas as sequências analisadas apresentaram menos de 80% de homologia com o conjunto de oligonucleótidos e sondas de *T. pallidum*.

A análise de reatividade cruzada *in silico* revelou 100% de homologia com *Treponema paraluisuniculi* (Taxid ID: 53435 e 545766). No entanto, de acordo com uma pesquisa no NCBI, estas sequências revelaram-se heterotípicas ou taxonomicamente sinónimas e também correspondem ao *Treponema pallidum*.

Portanto, nenhuma das sequências analisadas, incluindo as que apresentam uma homologia superior a 80%, pode afetar a deteção correta de *Treponema pallidum*.

Alfa-herpesvírus humano 1

Todas as sequências analisadas apresentaram menos de 80% de homologia com o conjunto de oligonucleótidos e sondas do HSV-1.

A análise de reatividade cruzada *in silico* revelou 98,33% de homologia com a estirpe 105640 do alfa-herpesvírus-1 do chimpanzé (Taxid ID: 332937). O hospedeiro desta estirpe de alfa-herpes vírus é o chimpanzé (*Pan troglodytes*). Os herpesvírus são altamente específicos do hospedeiro e partilham uma longa evolução sincrónica com os seus hospedeiros. No entanto, estes vírus não foram identificados em humanos e não são considerados zoonóticos neste momento, pelo que não interferem na deteção do HSV-1.

Portanto, nenhuma das sequências analisadas, incluindo as que apresentam uma homologia superior a 80%, pode afetar a deteção correta do HSV-1.

Alfa-herpesvírus humano 2

Todas as sequências analisadas apresentaram menos de 80% de homologia com o conjunto de oligonucleótidos e sondas de HSV-2.

Em conclusão, os desenhos dos alvos HSV-1, HSV-2 e *T. pallidum* do VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System não devem causar falsos positivos na deteção de *Treponema pallidum*, alfa-herpesvírus humano 1 e alfa-herpesvírus humano 2 quando estão presentes outros organismos.

Especificidade analítica: ensaio experimental

Reatividade cruzada: ensaio experimental

A reatividade cruzada do VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System foi confirmada testando um painel de diferentes microrganismos associados a sintomas de infecções sexualmente transmissíveis ou ambiental e filogeneticamente relevantes. Quando possível e estando disponíveis dados de concentração, os microrganismos interferentes foram avaliados em níveis clinicamente relevantes (habitualmente de 1E+05 – 1E+06 UFC (unidade formadora de colónias)/mL no caso de bactérias/fungos e de 1E+04 – 1E+05 UFP (unidade formadora de placa)/mL no caso de vírus). Não foi detetada nenhuma reatividade cruzada entre nenhum dos seguintes microrganismos testados, exceto os microrganismos visados.

Ensaio de reatividade cruzada				
<i>Acinetobacter baumannii</i> 5377 [NCDC KC 755]	-	<i>Haemophilus influenzae</i> , estirpe L-378	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 4b
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius 1863 CECT 2071	-	Hepatitis A HM175/18f	-	Vírus da varíola dos macacos
<i>Atopobium vaginae</i>	-	Vírus de herpes simples tipo-1 1st WHO IS for HSV-1	+	<i>Mycoplasma genitalium</i> , estirpe M30
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Vírus de herpes simples tipo-2 1st WHO IS for HSV-2	+	<i>Mycoplasma hominis</i> , estirpe LBD-4
<i>Candida albicans</i>	-	Vírus Herpes 2, estirpe MS	+	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , estirpe NCTC 8375 [B 5025]
<i>Candida glabrata</i>	-	Vírus herpes humano 1, estirpe HF	+	<i>Neisseria meningitidis</i> , estirpe M2091
<i>Candida krusei</i> Issatchenka orientalis Kudryavtsev 1960 CECT 1433	-	Vírus herpes humano 1, estirpe F	+	<i>Proteus mirabilis</i> NCDC 2059-70
<i>Candida parapsilosis</i>	-	Vírus herpes humano 1, estirpe KOS (ATCC-VR-1493)	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , estirpe RH 815
<i>Candida tropicalis</i> (Castellani) Berkhout 1923 CECT 1005	-	Vírus herpes humano 1, estirpe MacIntyre	+	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> serovar E	-	Vírus herpes humano 2, estirpe ATCC-2011-2	+	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i> , estirpe Seattle 1945
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Vírus herpes humano 2, estirpe G	+	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , estirpe 810-2
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	-	Vírus do papiloma humano 16	-	<i>Treponema pallidum</i> DNA Control, Vircell
<i>Enterococcus faecalis</i> , estirpe-tipo CECT 8120	-	Vírus do papiloma humano 18	-	<i>Treponema pallidum</i> , estirpe Nichols
<i>Enterococcus faecium</i> vanA, estirpe CECT 5253	-	<i>Klebsiella oxytoca</i> , estirpe MIT 10-5243	-	<i>Treponema pallidum</i> , estirpe SS14

Ensaio de reatividade cruzada					
Vírus Epstein-Barr 1st WHO IS for Epstein-Barr Virus EBV	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , estirpe UHKPC57	-	<i>Trichomonas vaginalis</i> , QCMD TV18S-01	-
<i>Escherichia coli</i> estirpe-tipo	-	<i>Listeria innocua</i>	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i> T-estirpe 960 (CX8) [960, CIP 103755, NCTC 10177]	-
<i>Gardnerella vaginalis</i> 594 [NCTC 10287]	-	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>londoniensis</i>	-	Vírus varicela zóster, estirpe Ellen	-
<i>Haemophilus ducreyi</i> Classe I	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 1/2	-		

Tabela 23. Microrganismos patogénicos de referência incluídos no ensaio de reatividade cruzada. O resultado + ou - refere-se ao resultado positivo ou negativo obtido nos diferentes canais, consoante o alvo detetado. No caso de um microrganismo testado ser um dos alvos detetados pelo dispositivo, obtém-se um resultado positivo no canal correspondente, mas obtém-se um resultado negativo nos outros canais.

Em conclusão, os resultados dos ensaios de reatividade cruzada indicam uma elevada especificidade do VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System, reduzindo assim o risco de resultados falsos positivos. Uma vez que não foram observadas amplificações não específicas com outros microrganismos relacionados, isto sugere que o dispositivo é capaz de distinguir com precisão os alvos.

Estudo de coinfecção

Foi realizado um estudo de coinfecção utilizando estirpes de vírus herpes humano 1, estirpe KOS (ATCC® VR-1493, Ref. FR-310 (IRR)), vírus de herpes simples tipo 2, estirpe MS (Ref. 0810006CF (Zeptometrix)) e *Treponema pallidum*, estirpe SS14 (Washington University) em diferentes concentrações, para confirmar que a presença de qualquer um deles, independentemente da concentração, não altera a deteção entre eles. Foram analisadas três amostras naturais de matriz negativa de lesão cutânea contaminadas com o material de referência, um alvo em baixa concentração (3xLoD) e os outros alvos em concentração muito alta, geralmente 1E+04 – 1E+05 unidades/mL, se possível.

Os resultados confirmam que a deteção dos microrganismos-alvo não é alterada quando analisada com o VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System em coinfecção em diferentes concentrações.

Estudo de agentes microbianos interferentes

Foi realizado um estudo de interferência microbiana para analisar os potenciais agentes microbianos interferentes para o VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Foi testado um painel de diferentes microrganismos relevantes do ponto de vista clínico, ambiental e filogenético na presença dos alvos *HSV-1, HSV-2* e *T. pallidum*, utilizando uma matriz natural negativa de lesão cutânea contaminada com vírus herpes humano 1, estirpe KOS (ATCC® VR-1493, Ref. FR-310 (IRR)), vírus de herpes simples tipo 2, estirpe MS (Ref. 0810006CF (Zeptometrix)) e *Treponema pallidum*, estirpe SS14 (Washington University). Quando possível e estando disponíveis dados de concentração, os vírus, as bactérias e/ou fungos interferentes foram avaliados a níveis clinicamente relevantes (habitualmente de 1E+05 – 1E+06 ufc (unidade formadora de colónias)/mL no caso de bactérias/fungos e de 1E+04 – 1E+05 ufp (unidade formadora de placa)/mL no caso de vírus).

Um controlo de matriz positiva (Positive Matrix Control, PMC) e um controlo de matriz negativa (Negative Matrix Control, NMC) foram incluídos como controlos do ensaio. O PMC corresponde à matriz negativa enriquecida (*spiked*) com estirpes-alvo específicas sem qualquer agente microbiano interferente, enquanto o NMC corresponde à matriz negativa sem qualquer agente microbiano interferente.

Nome do microrganismo	Concentração testada	Resultado
PMC	N/A	N.I
NMC	N/A	N.I
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Não disponível	N.I
<i>Atopobium vaginae</i>	4,52E+03 ufc/µL	N.I
<i>Candida albicans</i>	4,18E+03 ufc/µL	N.I
<i>Candida glabrata</i>	2,46E+03 ufc/µL	N.I
<i>Candida parapsilosis</i>	Não disponível	N.I
<i>Candida tropicalis</i>	3,04E+04 cp/µL	N.I
<i>Chlamydia trachomatis</i> serovar <i>E</i>	3,20E+06 IFU/mL	N.I
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,28E+03 ufc/µL	N.I
1st WHO IS for Epstein-Barr Virus EBV	5,00E+04 IU/mL	N.I
<i>Gardnerella vaginalis</i> 594 [NCTC 10287]	4,40E+05 ufc/mL	N.I
<i>Haemophilus ducreyi</i> Classe I	1,40E+02 cp/µL	N.I
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,20E+03 ufc/µL	N.I
Hepatite A	2,80E+03 TCID50/µL	N.I
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Não disponível	N.I
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Não disponível	N.I
<i>Listeria innocua</i>	Não disponível	N.I
<i>Listeria ivanovii</i> , subsp. <i>londoniensis</i>	Não disponível	N.I
<i>Listeria monocytogenes</i> (CECT 4031)	2,90E+03 ufc/µL	N.I
<i>Listeria monocytogenes</i> (CECT 935)	2,70E+03 ufc/µL	N.I
<i>Mycoplasma hominis</i>	4,40E+03 ufc/µL	N.I
<i>Mycoplasma genitalium</i>	3,80E+03 ufc/µL	N.I
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6,20E+03 ufc/µL	N.I
<i>Neisseria meningitidis</i>	5,70E+04 ufc/µL	N.I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,90E+04 ufc/µL	N.I
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,60E+04 ufc/µL	N.I
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	9,20E+03 ufc/µL	N.I
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	2,00E+04 ufc/µL	N.I
<i>Acinetobacter baumannii</i> 5377 [NCDC KC 755]	8,10E+05 ufc/mL	N.I
<i>Bacteroides fragilis</i>	3,40E+02 cp/µL	N.I
<i>Enterococcus faecalis</i> , estirpe-tipo	5,00E+05 ufc/mL	N.I
<i>Enterococcus faecium</i> vanA	3,50E+05 ufc/mL	N.I
Vírus do papiloma humano 16	1,00E+03 IU/µL	N.I
Vírus do papiloma humano 18	1,00E+03 IU/µL	N.I
<i>Serratia marcescens</i>	2,30E+05 ufc/mL	N.I
Vírus Varicella-Zoster	7,26E+04 ufc/mL	N.I
<i>Citrobacter freundii</i> , estirpe-tipo	6,20E+02 ufc/µL	N.I
<i>Escherichia coli</i> , estirpe-tipo	5,20E+02 ufc/µL	N.I
<i>Proteus mirabilis</i>	2,55E+01 ufc/µL	N.I
Vírus da varíola dos macacos	1,50E+03 cp/mL	N.I

Tabela 24. Ensaio de agentes microbianos interferentes. N.I. = Sem interferência, (PMC) = positive matrix control, (NMC) = negative matrix control, (TCID50): dose infeciosa em cultura de tecido 50% (sigla em inglês), (IU): unidades internacionais (sigla em inglês), (ufc): unidades formadoras de colónia, (cp): cópias, (IFU): unidade infeciosa.

Em conclusão, não foi observada nenhuma interferência na deteção do ácido nucleico-alvo com nenhum dos microrganismos testados.

Estudo de substâncias interferentes

Foi realizado um estudo de substâncias interferentes para testar o potencial efeito interferente de substâncias endógenas e exógenas sobre o VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Foram adicionadas um total de 22 substâncias potencialmente interferentes à matriz natural negativa de lesão cutânea contaminada com as estirpes de referência: vírus herpes humano 1, estirpe KOS (ATCC® VR-1493, Ref. FR-310 (IRR)), vírus de herpes simples tipo 2, estirpe MS (Ref. 0810006CF (Zeptometrix)) e *Treponema pallidum*, estirpe SS14 (Washington University); e avaliadas com seis réplicas.

Um controlo de matriz positiva (Positive Matrix Control, PMC) e um controlo de matriz negativa (Negative Matrix Control, NMC) foram incluídos como controlos do ensaio. O PMC corresponde à matriz negativa contaminada com estirpes-alvo específicas sem qualquer substância interferente, enquanto o NMC corresponde à matriz negativa sem substâncias interferentes nem microrganismos/material de referência adicionados. Os resultados seguintes foram obtidos:

Nome da substância	Concentração testada	Resultado
PMC	N/A	N.I.
NMC	N/A	N.I.
Aciclovir	6,60E-02 mg/mL	N.I.
Albumina	1,00E+01mg/mL	N.I.
Sangue total	1,00E+00% (v/v)	N.I.
Leucócitos/monócitos	1,00E+06 célula/mL	N.I.
Mucina	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Clamiox (hidrocortisona)	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Neosayomol (difenhidramina)	3,87E-02 mg/mL	N.I.
Letibalm (bálsamo labial)	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Caseína	7,00E+00 mg/mL	N.I.
Hemoal (benzocaína)	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Durex Frescor	5,00E+01 µl/mL	N.I.
SOIVRE Intim Oil	5,00E+01 µl/mL	I
	1,25E+01 µl/mL	N.I.
Liade	7,20E+00 mg/mL	N.I.
Urina feminina	1,00E+01% (v/v)	N.I.
Urina masculina	1,00E+01% (v/v)	N.I.
Fezes	2,20E-01 % (v/v)	N.I.
Sémen	5,00E+00% (v/v)	N.I.
Halibut	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Creme vaginal	7,50E-01 mg/mL	N.I.
Amido de milho	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Talquistina	2,64E+00% (v/v)	I
	6,60E-01% (v/v)	I
	3,30E-01% (v/v)	I
	1,70E-01% (v/v)	N.I.
Tioconazol	2,50E+00 mg/mL	N.I.

Tabela 25. Potenciais substâncias interferentes. N.I: sem interferência notificável / I: interfere.

Foram testadas diferentes substâncias potencialmente interferentes, tanto endógenas como exógenas, no VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Foi observada interferência ao testar SOIVRE Intim Oil a 50 µL/mL e Talquistina a 2,64% (v/v). Foram realizadas diluições até se atingir a concentração em que estes efeitos de interferência deixaram de ser observados: 12,5 µL/mL para SOIVRE Intim Oil e 0,17% (v/v) para Talquistina. Os resultados obtidos conduziram à conclusão de que, nas concentrações finais testadas, não se observa nenhuma interferência de nenhuma das substâncias avaliadas.

12.5.2. Reatividade analítica

A reatividade analítica pode ser definida como a percentagem de estirpes microbianas-alvo ou de amostras de DNA/RNA que fornecem o resultado positivo correto. A reatividade analítica foi estudada *in silico* e através de ensaios experimentais.

Análise *in silico* da reatividade analítica

A reatividade analítica do VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System foi avaliada utilizando bases de dados de sequências de nucleótidos de acesso público, como o NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), e um software interno de análise bioinformática, de modo a demonstrar que os genes-alvo podem ser corretamente detetados pelo dispositivo em estudo. A análise *in silico* do desenho dos oligonucleótidos e das sondas foi realizada através do alinhamento com um total de 4941 sequências analisadas (sequências descarregadas da base de dados com duplicados removidos) para *T. pallidum*, 9779 para HSV-1 e 8689 para HSV-2. Os resultados obtidos são mostrados na tabela seguinte:

Treponema pallidum					
Gene	Sequências alinhadas: 607				
	Sem mismatches	Com mismatches	Sequências com deteção confirmada	Sequências sem deteção	Sequências com deteção desconhecida
16S rRNA	99,84%	0,16%	99,84%	0%	0,16%
Alfa-herpesvírus humano 1					
Gene	Sequências alinhadas: 513				
	Sem mismatches	Com mismatches	Sequências com deteção confirmada	Sequências sem deteção	Sequências com deteção desconhecida
UL1	87,33%	12,67%	97,66%	0%	2,34%
Alfa-herpesvírus humano 2					
Gene	Sequências alinhadas: 549				
	Sem mismatches	Com mismatches	Sequências com deteção confirmada	Sequências sem deteção	Sequências com deteção desconhecida
US4	93,44%	6,56%	93,44%	0%	6,56%

Tabela 26. Reatividade analítica, ensaio *in silico*. “Sequências alinhadas” = número de sequências alinhadas sem ou com discrepâncias a partir do total de sequências analisadas, “Sequências com deteção confirmada” = sequências sem discrepâncias ou analisadas experimentalmente cuja deteção é garantida, “Sequências sem deteção” = sequências previamente analisadas *in silico* cuja deteção experimental não pode ser garantida devido a evidências experimentais negativas anteriores, “Sequências com deteção desconhecida” = sequências previamente analisadas *in silico* cuja deteção experimental não pode ser garantida devido à falta de evidências experimentais.

Em resumo, a análise de inclusividade demonstrou uma deteção correta dos genes 16S rRNA, UL1 e US4 de *T. pallidum*, HSV-1 e HSV-2, respectivamente, com o VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

Reatividade analítica, ensaio experimental

A reatividade analítica do VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System para HSV-1 foi avaliada comparativamente com o DNA do vírus herpes humano 1, estirpe HF (código ATCC VR-260), vírus herpes humano 1, estirpe MacIntyre (código ATCC VR-539), vírus herpes humano 1, estirpe F (código ATCC VR-733) e “1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-1 (HSV-1) (NIBSC 16/368)”, apresentando resultados positivos.

A reatividade analítica do VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System para HSV-2 foi avaliada comparativamente com o DNA do vírus herpes humano 2, estirpe G (código ATCC VR-3393), vírus herpes humano 2, estirpe ATCC-2011-2 (código ATCC VR-1779) e “1st WHO IS for Herpes Simplex Virus type-2 (HSV-2) (NIBSC 17/122)”, apresentando resultados positivos.

A reatividade analítica do VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System para *T. pallidum* foi avaliada comparativamente com o DNA do *Treponema pallidum*, estirpe Nichols (University of Washington) e *Treponema pallidum* DNA Control (Vircell MBC109), apresentando resultados positivos.

12.6. Rastreabilidade metrológica

Este ensaio não foi concebido para fins de medição.

13. Características de desempenho clínico

O desempenho clínico do VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System foi testado utilizando amostras de esfregaços de lesões cutâneas anogenitais e orais recolhidas por pessoal de enfermagem utilizando o Copan eSwab®. Para a colheita, o esfregaço estéril (FLOQSwab) foi colocado no frasco fornecido contendo 1 mL de Copan's Liquid Amies Elution Swab. Os resultados foram os seguintes:

	Centro	Tipo de amostra	Fluxo de trabalho	Alvo
1	Certest Biotec S.L. (Saragoça, Espanha) em colaboração com o Hospital Universitario Miguel Servet (Saragoça, Espanha) utilizando amostras do Biobanco del Sistema de Salud de Aragón (BSSA)	Esfregaço de lesão cutânea anogenital e oral (Estudo retrospectivo)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	HSV-1
				HSV-2
				<i>T. pallidum</i>
2	Certest Biotec S.L. (Saragoça, Espanha) utilizando amostras da Cerba Xpert	Esfregaço de lesão cutânea anogenital e oral (Estudo retrospectivo)	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	HSV-1
				HSV-2
				<i>T. pallidum</i>

Tabela 27. Centro, tipo de amostra, fluxo de trabalho e alvo.

Foram calculados os verdadeiros valores positivos e negativos, os valores de falsos positivos e negativos, a sensibilidade, a especificidade, os valores preditivos positivos (PPV), os valores preditivos negativos (NPV) e os rácios de probabilidade (LR) para o VIASURE *HSV-1, HSV-2 & Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System. Os resultados e a análise dos diferentes estudos foram compilados como um único valor de referência devido ao facto de ambos os estudos terem utilizado o mesmo método de referência, o mesmo tipo de amostras e os mesmos critérios de inclusão/exclusão. Os resultados são apresentados na tabela seguinte:

Centro	Ensaio comparador	Alvo	TP	TN	FP	FN	Sensibilidade	Especificidade	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. Valores de verdadeiro positivo (TP) e negativo (TN), valores de falso positivo (FP) e negativo (FN), sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos (PPV), valores preditivos negativos (NPV) e os rácios de probabilidade (LR) para o VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

Em conclusão, os resultados mostram uma concordância elevada para detetar HSV-1, HSV-2 e *T. pallidum* utilizando o VIASURE HSV-1, HSV-2 & *Treponema pallidum* Assay for BD MAX™ System.

Bibliografía

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

Símbolos para componentes IVD e reagentes

IVD	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>		Armazenar em local seco		Data de validade		Fabricante	LOT	Número de lote
	Consultar as instruções de utilização		Limitação de temperatura		Contém <n> ensaio(s)		Identificação única de dispositivo	REF	Número de referência
	Marcação CE		Manter ao abrigo da luz solar						

Marcas comerciais

BD MAX™ é uma marca registada da Becton, Dickinson and Company.

Direitos de modificação reservados. Todos os direitos reservados. © Certest Biotec, S.L.

Todas as outras marcas comerciais que possam aparecer neste folheto informativo são propriedade dos respetivos titulares.



Certest Biotec, S.L.

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

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

Informações sobre o representante na Austrália:

Becton Dickinson Pty Ltd., 66 Waterloo Road.

Macquarie Park NSW 2113, Austrália

Informações sobre o representante na Nova Zelândia:

Becton Dickinson Limited, 14B George Bourke Drive.

Mt. Wellington Auckland 1060, Nova Zelândia

Controlo de alterações		
Versão n.º	Alterações	Data
00	Versão original Esta versão é uma tradução do documento original em inglês: IUo-444222en0725.00	27-07-2025

Tabela A 2. Tabela de controlo de alterações.

Revisão: 00



 **Certest Biotec, S.L.**

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

 (+34) 976 520 354

 viasure@certest.es

 www.certest.es

certest
F-566 rev.03

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