



ResistancePlus® MG

Test de PCR multiplexe en temps réel pour l'identification de *Mycoplasma genitalium* et la détection des mutations associées à la résistance à l'azithromycine



Produit	Plateforme	Taille (réactions)	Référence
ResistancePlus® MG	LC480 II z 480	100	REF 20001L-01
ResistancePlus® MG	LC480 II z 480	25	REF 2000125
ResistancePlus® MG ₍₅₅₀₎	ABI 7500 Fast ABI 7500 Fast Dx	100	REF 2000201
ResistancePlus® MG ₍₅₅₀₎	ABI 7500 Fast ABI 7500 Fast Dx	25	REF 2000225
ResistancePlus® MG ₍₆₇₅₎	CFX96™ Dx CFX96™ Touch	100	REF 2000301
ResistancePlus® MG ₍₆₇₅₎	CFX96™ Dx CFX96™ Touch	25	REF 2000325

Produits accessoires – Logiciel d'analyse

ResistancePlus® MG (LC480)	REF 99003
ResistancePlus® MG (z480)	REF 99018
ResistancePlus® MG (7500)	REF 99002
ResistancePlus® MG (CFX)	REF 99008
REFLEX ResistancePlus® MG (LC480)	REF 99023
REFLEX ResistancePlus® MG (z480)	REF 99024
REFLEX ResistancePlus® MG (7500)	REF 99026
REFLEX ResistancePlus® MG (CFX)	REF 99025

EC REP MT Promedt Consulting GmbH
 Altenhofstrasse 80
 66386 St. Ingbert, Allemagne
 Tél. : +49 6894 581020, E-mail : info@mt-procons.com

SpeedX Pty Ltd
 Suite 102 National Innovation Centre
 Australian Technology Park, 4 Cornwallis Street, Eveleigh
 Sydney, NSW 2015, Australie
 Tél : +61 2 9209 4170, E-mail : tech@speedx.com.au

RÉSERVÉ À UN USAGE PROFESSIONNEL
 Non destiné à la vente aux États-Unis

Contenus

1	Description du produit	5
2	Usage prévu	5
3	Informations sur les pathogènes	5
4	Contenu du kit.....	6
5	Expédition et stockage.....	7
6	Avertissements et précautions	7
6.1	Avertissements et précautions d'ordre général	7
6.2	Laboratoire.....	7
6.3	Manipulation des échantillons.....	8
6.4	Test.....	8
6.5	Précautions de sécurité	8
7	Matériel requis mais non fourni	8
8	Matériel conseillé mais non fourni	9
9	Principe de la technologie	10
10	Vue d'ensemble de la procédure.....	12
11	Détails de la procédure	13
11.1	Prélèvement, transport et stockage des échantillons	13
11.1.1	Dispositifs validés de prélèvement d'échantillon	13
11.1.2	Extraits d'échantillons validés	13
11.2	Traitement des échantillons.....	13
11.2.1	Stockage des échantillons extraits.....	14
11.3	Internal Control (IC) (Contrôle interne (CI)).....	14
11.3.1	Contrôle interne sur le MagNA Pure 96	14
11.3.2	Internal Control (Contrôle interne) sur le MICROLAB STARlet IVD.....	15
11.3.3	Contrôle interne sur le QIASymphony® SP	15
11.3.4	Contrôle interne sur le easyMAG®	15
11.4	Préparation de la PCR en temps réel	17
11.4.1	Préparation du mélange de solution-mère	17
11.4.2	Stabilité du mélange de solution-mère.....	17
11.5	Préparation de la PCR avec des extraits d'acide nucléique (flux de travail reflex).....	17
12	Programmation et analyse	18
13	Interprétation des résultats.....	18
14	Limitations.....	19
15	Contrôle de qualité.....	19
16	Consignes d'utilisation des contrôles positifs ResistancePlus® MG	20
16.1	Mode d'emploi.....	20
17	Caractéristiques de performance	21
17.1	Performance clinique.....	21
17.1.1	Étude clinique 1	21
17.1.2	Étude clinique 2.....	23
17.1.3	Étude clinique 3.....	23
17.1.4	Étude clinique 4.....	25
17.1.5	Étude clinique 5.....	27

17.1.6	Étude clinique 6.....	28
17.1.7	Étude clinique 7.....	30
17.2	Performance analytique.....	32
17.2.1	Reproductibilité et répétabilité.....	32
17.2.2	Sensibilité analytique.....	36
17.2.3	Spécificité analytique.....	36
17.2.4	Substances potentiellement interférentes.....	37
18	Service clients et assistance technique.....	39
19	Références.....	40
20	Annexe 1 : LightCycler® 480 instrument II.....	41
20.1	Programmation du LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II).....	41
20.2	Colour Compensation (Compensation de couleur) pour LightCycler® 480 Instrument II.....	45
20.3	Interprétation des résultats.....	46
21	Annexe 2 : analyseur cobas z 480.....	47
21.1	Programmation de l'analyseur cobas z 480.....	47
21.2	Colour Compensation (compensation de couleur) pour l'analyseur cobas z 480.....	51
21.3	Interprétation des résultats.....	52
22	Annexe 3 : Applied Biosystems® 7500 Fast.....	53
22.1	Programmation du système Applied Biosystems® 7500 Fast.....	53
22.2	Interprétation des résultats.....	56
23	Annexe 4 : Applied Biosystems® 7500 Fast Dx.....	57
23.1	Programmation du système Applied Biosystems® 7500 Fast Dx.....	57
23.2	Interprétation des résultats.....	61
24	Annexe 5 : Systèmes de PCR en temps réel Bio-Rad CFX96™ Dx et CFX96 Touch™.....	62
24.1	Programmation des systèmes de PCR en temps réel CFX96™ Dx et CFX96 Touch™.....	62
24.2	Interprétation des résultats.....	65
25	Annexe A : interprétation des résultats.....	66
25.1	Device set up (Configuration du dispositif) (nouvel utilisateur ou nouveau dispositif).....	66
25.1.1	Compensation de couleur.....	67
25.2	Module de test (nouvel utilisateur).....	67
25.3	Dénomination des échantillons.....	68
25.4	Ajouter des numéros de lot de mélange.....	68
25.5	Analyse.....	69
25.6	Résultats.....	71
25.7	Courbe de référence.....	71
25.8	Aperçu des résultats.....	72
25.9	Exporter des résultats.....	72
25.10	Exemple de graphes pour contrôle.....	73
25.10.1	<i>M. genitalium</i> , contrôle pour mutation de l'ARNr 23S (Pa).....	73
25.10.2	<i>M. genitalium</i> , contrôle ARNr 23S de type sauvage (Pb).....	73
25.10.3	<i>M. genitalium</i> , contrôle négatif (N) (échantillon négatif).....	74
25.11	Exemples.....	74
25.11.1	Exemple 1. Échantillon <i>M. genitalium</i> , échantillon ARNr 23S de type sauvage avec un nombre faible de copies.....	74

25.11.2	Exemple 2. Échantillon <i>M. genitalium</i> , échantillon ARNr 23S de type sauvage avec un nombre faible de copies.....	75
25.11.3	Exemple 3. Échantillon <i>M. genitalium</i> , mutation de l'ARNr 23S.....	75
25.11.4	Exemple 4. Échantillon <i>M. genitalium</i> , mutation de l'ARNr 23S.....	75
25.11.5	Exemple 5. Échantillon négatif.....	76
25.11.6	Exemple 6. Échantillon Non valide.....	76
25.11.7	Exemple 7. Échantillons à corriger – Signal négatif	76
25.11.8	Exemple 8. Échantillons à corriger – Signal non concluant	78
26	Glossaire	79

1 Description du produit

Le kit **ResistancePlus**[®] MG détecte simultanément le *M. genitalium* and 5 mutations aux positions 2058 et 2059 dans le gène ARNr 23S (numérotation pour *E. coli*) qui sont associés à la résistance à l'azithromycine (antibiotique à base de macrolide). Le kit **ResistancePlus**[®] MG est un test par PCR en temps réel multiplexe à 1 puits composé de 3 systèmes de lecture. Le Readout 1 (système de lecture 1) indique la présence ou l'absence de *M. genitalium* par la détection du gène MgPa ; le readout 2 (système de lecture 2) indique la présence d'une mutation A2058G, A2059G, A2058T, A2058C ou A2059C sur le gène de l'ARNr 23S ; et le readout 3 (système de lecture 3) est un contrôle interne qui surveille l'efficacité de l'extraction et l'inhibition de la qPCR. Le kit **ResistancePlus**[®] MG utilise **PlexZyme**[®] et **PlexPrime**[®] pour la spécificité et pour une capacité de multiplexage supérieure. Le test est validé sur des échantillons extraits en utilisant le système MagNA Pure 96 System (Roche), MICROLAB STARlet IVD (Hamilton), QIAAsymphony[®] SP (QIAGEN), NUCLISENS[®] easyMAG[®] (Biomérieux) et la détection en temps réel sur le Roche LightCycler[®] 480 Instrument II (LC480 II), l'analyseur cobas z 480 (z480), le système Applied Biosystems[®] 7500 Fast (7500 Fast), le système Applied Biosystems[®] 7500 Fast Dx (7500 Fast Dx) et les systèmes de détection par PCR en temps réel Bio-Rad CFX96[™] Dx (CFX96 Dx) et CFX96 Touch[™] (CFX96 Touch) .

2 Usage prévu

Le kit **ResistancePlus**[®] MG est un test qualitatif multiplexe de diagnostic in vitro par PCR en temps réel pour l'identification de *M. genitalium* et la détection de 5 mutations sur le gène de l'ARNr 23S (A2058G, A2059G, A2058T, A2058C et A2059C, numérotation pour *Escherichia coli*) qui sont associées à la résistance à l'azithromycine (un antibiotique de la famille des macrolides). Il est destiné à aider au diagnostic du *M. genitalium* et il détecte les mutations associées à la résistance à l'azithromycine chez le *M. genitalium*. Il doit être utilisé conjointement avec les informations cliniques et d'autres données de laboratoire.

Le kit **ResistancePlus**[®] MG peut être utilisé avec les types de prélèvements suivants : urine masculine et féminine et écouvillons anaux, rectaux, cervicaux, endocervicaux, vaginaux, urétraux, péniens, péniens méatiques et pharyngés, provenant de patients symptomatiques et asymptomatiques.

Des résultats négatifs n'excluent pas les infections à *M. genitalium* et ne confirment pas la sensibilité à l'azithromycine car il peut exister d'autres mécanismes d'échec thérapeutique.

Le kit **ResistancePlus**[®] MG doit être utilisé dans des structures professionnelles, telles que des hôpitaux ou des laboratoires de référence ou d'État. Il n'est pas destiné à un auto-test, un usage à domicile ou un usage sur le lieu des soins.

3 Informations sur les pathogènes

Le *M. genitalium* est une petite bactérie présente dans les voies urogénitales humaines. Le *M. genitalium* a été associé à plusieurs infections sexuellement transmissibles (IST) Chez l'homme, la bactérie est la deuxième cause la plus fréquente d'urétrite non gonococcique (UNG) et elle est également associée à la prostatite, à l'épididymite et à la balanoposthite, et à l'inflammation du gland du pénis et du prépuce¹. Chez la femme, elle est associée à la cervicite, à la maladie inflammatoire pelvienne (MIP), notamment l'endométrite (inflammation de la muqueuse de l'endomètre) et la salpingite (inflammation des trompes de Fallope)^{1,2,3}.

L'azithromycine est utilisée couramment pour le traitement de *M. genitalium* et pour la prise en charge des syndromes des IST tels que l'UNG et la cervicite. L'azithromycine appartient à la classe d'antibiotiques des macrolides, et elle agit en se fixant à l'ARNr 23S pour inhiber la synthèse protéique. Des mutations ponctuelles du gène ARNr 23S de *M. genitalium*, aux positions A2058G, A2059G, A2058T, A2058C et A2059C (numérotation pour *E. coli*) ont été associées à l'échec du traitement et/ou une résistance *in vitro* à l'azithromycine^{4,5}. Les mutations les plus fréquentes sont A2058G et A2059G, qui représentent 89 % des mutations de résistance aux macrolides d'après une étude récente⁶.

4 Contenu du kit

Tableau 1. Contenus des kits <i>ResistancePlus</i> [®] MG				
Couleur du capuchon	Contenus	Description	Réf. 20001L-01 (100 réactions)	Réf. 2000125 (25 réactions)
Bleu	<i>Plex</i> Mastermix (Mélange de solution mère <i>Plex</i>), 2x	Mélange de solution-mère contenant les composants requis pour la qPCR, notamment des dNTP, du MgCl ₂ , de l'ADN polymérase et du tampon	1 x 1 ml	1 x 250 µl
Marron	MG+23S Mix (Mélange MG+23S), 20x	Mélange contenant des oligonucléotides [^] pour l'amplification et la détection amplification de <i>M. genitalium</i> et les mutations ARNr 23S.	1 x 100 µl	1 x 25 µl
Blanc	Control Mix 1 (Mélange de contrôle 1), 20x	Mélange contenant des oligonucléotides [^] pour l'amplification et la détection du test de contrôle interne pour LC480 II et z 480.	1 x 100 µl	1 x 25 µl
Rouge	Internal Control cells (Cellules de contrôle interne) [#]	Cellules de contrôle interne contenant la matrice d'ADN de contrôle interne pour surveiller l'efficacité de l'extraction et de l'amplification	1 x 500 µl	1 x 100 µl
Neutre	Nuclease Free Water (Eau sans nucléase)	Eau de qualité PCR	1 x 1 ml	1 x 1 ml

Conserver les tubes de matrices dans un endroit différent des mélanges d'oligonucléotides, c.-à-d. une salle de manipulation de matrice ou d'acide nucléique

[^] Les oligonucléotides sont des paires d'amorce PCR (notamment les amorces *PlexPrime*[®]), des enzymes *PlexZyme*[®] et des sondes fluorescentes.

Tableau 2. Contenus des kits <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₅₅₀₎				
Couleur du capuchon	Contenus	Description	Réf. 2000201 (100 réactions)	Réf. 2000225 (25 réactions)
Bleu	<i>Plex</i> Mastermix (Mélange de solution mère <i>Plex</i>), 2x	Mélange de solution-mère contenant les composants requis pour la qPCR, notamment des dNTP, du MgCl ₂ , de l'ADN polymérase et du tampon	1 x 1 ml	1 x 250 µl
Marron	MG+23S Mix (Mélange MG+23S), 20x	Mélange contenant des oligonucléotides [^] pour l'amplification et la détection amplification de <i>M. genitalium</i> et les mutations ARNr 23S.	1 x 100 µl	1 x 25 µl
Blanc	Control Mix 2 (Mélange de contrôle 2), 20x	Mélange contenant des oligonucléotides [^] pour l'amplification et la détection du test de contrôle interne pour 7500 Fast et 7500 Fast Dx	1 x 100 µl	1 x 25 µl
Rouge	Internal Control cells (Cellules de contrôle interne) [#]	Cellules de contrôle interne contenant la matrice d'ADN de contrôle interne pour surveiller l'efficacité de l'extraction et de l'amplification	1 x 500 µl	1 x 100 µl
Neutre	Nuclease Free Water (Eau sans nucléase)	Eau de qualité PCR	1 x 1 ml	1 x 1 ml

Conserver les tubes de matrices dans un endroit différent des mélanges d'oligonucléotides, c.-à-d. une salle de manipulation de matrice ou d'acide nucléique

[^] Les oligonucléotides sont des paires d'amorce PCR (notamment les amorces *PlexPrime*[®]), des enzymes *PlexZyme*[®] et des sondes fluorescentes.

Tableau 3. Contenus des kits <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎				
Couleur du capuchon	Contenus	Description	Réf. 2000301 (100 réactions)	Réf. 2000325 (25 réactions)
Bleu	<i>Plex</i> Mastermix (Mélange de solution mère <i>Plex</i>), 2x	Mélange de solution-mère contenant les composants requis pour la qPCR, notamment des dNTP, du MgCl ₂ , de l'ADN polymérase et du tampon	1 x 1 ml	1 x 250 µl
Marron	MG+23S Mix (Mélange MG+23S), 20x	Mélange contenant des oligonucléotides [^] pour l'amplification et la détection amplification de <i>M. genitalium</i> et les mutations ARNr 23S.	1 x 100 µl	1 x 25 µl
Blanc	Control Mix 3 (Mélange de contrôle 3), 20x	Mélange contenant des oligonucléotides [^] pour l'amplification et la détection du test de contrôle interne dans le système CFX96 Dx et pour CFX96 Touch	1 x 100 µl	1 x 25 µl
Rouge	Internal Control cells (Cellules de contrôle interne) [#]	Cellules de contrôle interne contenant la matrice d'ADN de contrôle interne pour surveiller l'efficacité de l'extraction et de l'amplification	1 x 500 µl	1 x 100 µl
Neutre	Nuclease Free Water (Eau sans nucléase)	Eau de qualité PCR	1 x 1 ml	1 x 1 ml

Conserver les tubes de matrices dans un endroit différent des mélanges d'oligonucléotides, c.-à-d. une salle de manipulation de matrice ou d'acide nucléique

[^] Les oligonucléotides sont des paires d'amorce PCR (notamment les amorces *PlexPrime*[®]), des enzymes *PlexZyme*[®] et des sondes fluorescentes.

5 Expédition et stockage

- Les composants des kits *ResistancePlus*[®] MG sont livrés sur de la glace sèche ou des packs de refroidissement. Tous les composants doivent être conservés à -20 °C dès leur réception. Il est recommandé de ne pas dépasser 15 cycles de congélation/décongélation.
- Quand le kit est conservé conformément aux conditions recommandées et qu'il est manipulé correctement, il conserve son activité jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Ne pas l'utiliser après la date de péremption.

6 Avertissements et précautions

6.1 Avertissements et précautions d'ordre général

- Destiné exclusivement à un usage de diagnostic *in vitro*.
- Lire attentivement ce mode d'emploi avant l'utilisation. Respecter rigoureusement les procédures décrites pour garantir la fiabilité des résultats de test. Toute déviation de ces procédures peut affecter la performance du test.
- Les utilisateurs doivent avoir suivi une formation adéquate dans l'utilisation du test *ResistancePlus*[®].

6.2 Laboratoire

- Il est recommandé d'effectuer la préparation/l'extraction des échantillons, la préparation du mélange de solution-mère, l'ajout des échantillons et le thermocyclage dans des zones séparées spatialement. Au minimum, l'instrument de PCR doit, idéalement, être situé dans une salle distincte des zones où les réactions sont préparées.
- Il est recommandé de suivre les précautions de laboratoire habituelles. Porter un équipement de protection individuelle approprié, comme des gants, des lunettes de protection et une blouse de laboratoire pour manipuler les réactifs.
- Des organismes pathogènes sont susceptibles d'être présents dans les échantillons cliniques. Traiter tous les échantillons cliniques comme étant potentiellement infectieux et respecter les procédures de sécurité de votre organisation en matière de manipulation des échantillons chimiques et biologiques.
- Respecter les procédures d'élimination des déchets dangereux de votre organisation pour l'élimination correcte des échantillons, des réactifs et d'autres matières potentiellement contaminées.

6.3 Manipulation des échantillons

- Les échantillons doivent être recueillis, transportés et stockés en utilisant les techniques de laboratoire standard ou conformément aux instructions des kits de prélèvement.

6.4 Test

- Les précautions de base pour prévenir la contamination des réactions de PCR comprennent l'utilisation d'embouts de pipette à filtre stériles, l'utilisation d'un nouvel embout de pipette pour chaque action de pipetage et la séparation des flux de travail.
- Les tests de PCR sont sujets à la contamination par les produits de PCR précédents. Ne jamais ouvrir les cuves à réaction après l'achèvement de la PCR.

6.5 Précautions de sécurité

- Des fiches de données de sécurité (FDS) sont disponibles sur demande. Contacter tech@speedx.com.au pour de plus amples informations.

7 Matériel requis mais non fourni

Consommables de laboratoire généraux

- Gants et blouses de laboratoire propres
- Mélangeur vortex
- Centrifugeuse de paillasse pour tubes de 0,5 et 1,5 ml
- Micro-pipeteurs
- Embouts de pipette résistants aux aérosols, stériles
- Tubes de 0,5 ml et 1,5 ml (qualité PCR)

Pour le MagNA Pure 96 Instrument

- Phosphate Buffered Saline (PBS) (Tampon phosphate salin) 1x
- MagNA Pure 96 Internal Control Tube (Tube de contrôle interne, Roche, réf. 06374905001)
- MagNA Pure 96 DNA et Viral NA Small Volume Kit (kit petit volume, Roche, réf. 06543588001)
- MagNA Pure 96 DNA et Viral NA Large Volume Kit (kit grand volume, Roche réf. 06374891001)
- MagNA Pure 96 System Fluid (external) (Système de fluide externe, Roche, réf. 06640729001)
- MagNA Pure 96 Processing Cartridge (Cartouche de traitement, Roche, réf. 06241603001)
- MagNA Pure 96 Pure tip 1000uL (Embout, Roche, réf. 6241620001)
- MagNA Pure 96 Output Plate (plaque de sortie, Roche, réf. 06241611001)
- MagNA Pure Sealing Foil (feuille d'hermétisation, Roche, réf. 06241638001)

Pour l'instrument MICROLAB STARlet

- Phosphate Buffered Saline (PBS) (Tampon phosphate salin) 1x
- STARMag 96 X 4 Universal Cartridge kit (384T) (Kit de cartouche universelle, Seegene, réf. 744300.4.UC384)
- Tubes de 2,0 ml

Pour l'instrument QIASymphony® SP

- Phosphate Buffered Saline (PBS) (Tampon phosphate salin) 1x
- Cartouches de préparation d'échantillon, 8 puits (Qiagen, réf. 997002)
- Manchons 8 barreaux (Qiagen, réf. 997004)
- Pointes de filtre, 200 µl et 1500 µl (Qiagen, réf. 990332 et 997024)

- Tubes 2 ml (Sarstedt, réf. 72.639 ou 72.694)
- Tubes en polystyrène 14 ml (Corning, réf. 352051)
- Kit DSP Virus/Pathogen Mini (QIAGEN, Cat no 937036)

Pour le NucliSENS® easyMAG® instrument

- Phosphate Buffered Saline (PBS) (Tampon phosphate salin) 1x
- NucliSENS® easyMAG® Lys Buffer 4 X 1 l (tampon lyse Biomérieux, réf. 280134)
- NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer 2 ml 48T (tampon lyse Biomérieux, réf. 200292)
- NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica (Silice magnétique, Biomerieux, réf. 280133)
- NucliSENS® easyMAG® Extraction buffer 1 (Tampon d'extraction 1, Biomerieux, réf. 280130)
- NucliSENS® easyMAG® Extraction buffer 2 (Tampon d'extraction 2, Biomerieux, réf. 280131)
- NucliSENS® easyMAG® Extraction buffer 3 (Tampon d'extraction 3, Biomerieux, réf. 280132)
- NucliSENS® easyMAG® Disposables (Jetables, Biomerieux, réf. 280135)

Pour le LightCycler® 480 Instrument II et l'analyseur cobas z 480

- **PlexPCR®** Colour Compensation (CC) kit (Kit de compensation de couleur, SpeedX, Cat no 90001)
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (plaque à 96 puits, Roche, réf. 04729692001)
- LightCycler® 480 Sealing Foil (feuille d'hermétisation, Roche, réf. 04729757001)

Pour le système Applied Biosystems® 7500 Fast et le système 7500 Fast Dx

- MicroAmp® Optical 96-well reaction plates (plaques de réaction à 96 puits, ThermoFisher Scientific, réf. 4316813)
- MicroAmp® Optical Adhesive Film (film optique adhésif, ThermoFisher Scientific, réf. 4360954)

Pour le Bio-Rad CFX96™ Dx et le CFX96 Touch™ Real-time PCR Detection System

- Multiplate™ 96-well PCR plates (plaques PCR à 96 puits, Bio-Rad, réf. MLP9601)
- Microseal® 'B' PCR Plate Sealing Film, adhesive, optical (film adhésif et optique d'hermétisation, Bio-Rad, réf. MSB1001)

8 Matériel conseillé mais non fourni

Matériel de contrôle positif et négatif

- **ResistancePlus®** MG Positive Control kit (kit de contrôle positif SpeedX, Cat no 95001)
- Échantillon négatif connu

9 Principe de la technologie

La PCR en temps réel (qPCR) peut être utilisée pour amplifier et détecter les acides nucléiques cibles spécifiques des pathogènes. **PlexPCR[®]** est une technologie qPCR utilisant les enzymes **PlexZyme[®]** qui détecte et signale le produit amplifié en produisant un signal fluorescent (**Figure 1**). Les amorces **PlexPrime[®]** sont associées pour l'amplification spécifique de séquences mutantes, associée à la détection **PlexZyme[®]** spécifique des mutants (**Figure 2**).

Les enzymes **PlexZyme[®]** sont des complexes d'ADN catalytiques composés de deux oligonucléotides d'ADN désignés par le terme « enzymes partielles ». Chaque enzyme partielle possède une région spécifique à une cible, une âme catalytique et une région universelle de liaison de la sonde. Quand le produit cible est présent, les deux enzymes partielles se lient côte-à-côte pour former l'enzyme **PlexZyme[®]** active possédant l'activité catalytique pour cliver une sonde marquée. Le clivage sépare les colorants du fluorophore et du désactivateur, produisant un signal fluorescent qui peut être surveillé en temps réel. Les enzymes **PlexZyme[®]** ont une spécificité supplémentaire par rapport aux autres technologies de détection, car deux enzymes partielles doivent se lier pour la détection. Les enzymes **PlexZyme[®]** sont également des enzymes à renouvellement multiple, et plusieurs sondes peuvent être clivées au cours de chaque cycle de PCR, produisant un signal puissant et sensible. En raison de la sensibilité et la spécificité élevées des tests **PlexZyme[®]**, ceux-ci sont parfaits pour la détection multiplexe de pathogènes.

Les amorces **PlexPrime[®]** possèdent trois régions fonctionnelles. La région 5' longue, qui fixe l'amorce à un emplacement spécifique et la région 3' courte, qui cible de manière sélective l'extension à partir de la base mutante. Une séquence d'insertion se situe entre les régions 5' et 3' et agit comme une structure de liaison qui insère une séquence indépendante de la cible dans l'amplicon résultant et améliore la pression de sélection de la région 3'. Dans la réaction multiplexe, chaque amorce **PlexPrime[®]** est conçue pour cibler une base mutante spécifique et intègre une séquence d'insertion unique, ce qui produit ainsi des séquences d'amplicon mutant distinctes. Contrairement aux autres technologies de détection basées sur les sondes, l'enzyme **PlexZyme[®]** peut être superposée avec l'amorce **PlexPrime[®]** pour cibler l'amplicon mutant spécifique contenant la base mutante et la séquence d'insertion incorporée. L'association unique des amorces **PlexPrime[®]** couplées aux enzymes **PlexZyme[®]** permet l'amplification spécifique de séquences mutantes, et la détection sensible et spécifique dans une réaction multiplexe.

Figure 1. Représentation schématique de la détection et de la signalisation universelle de **PlexZyme[®]**

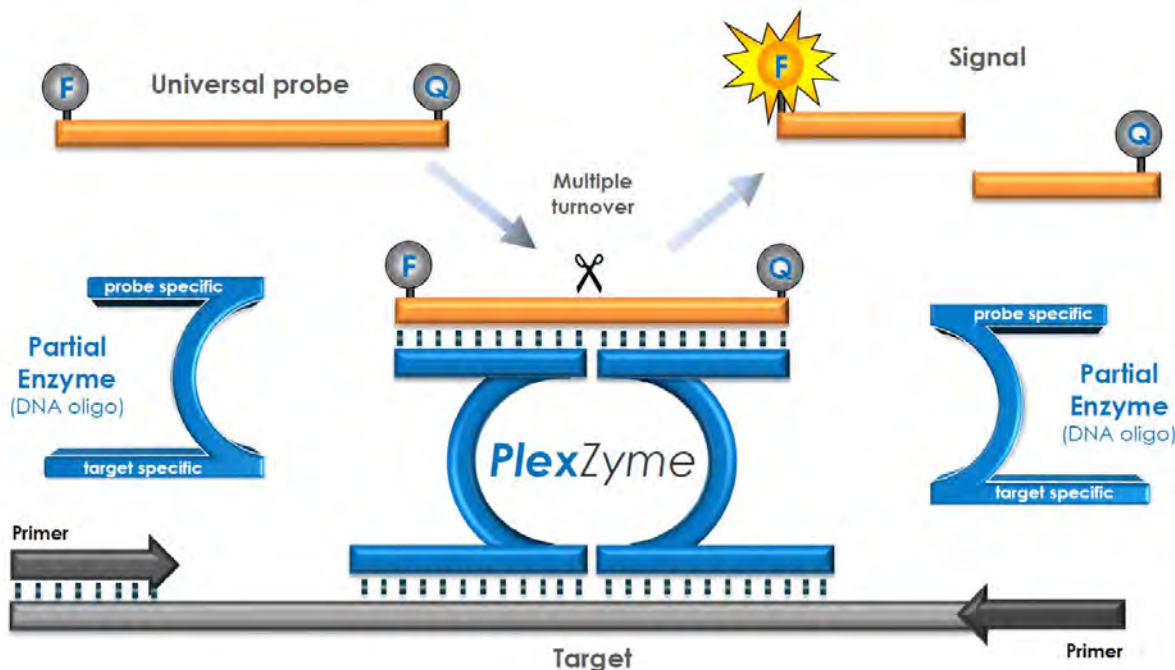
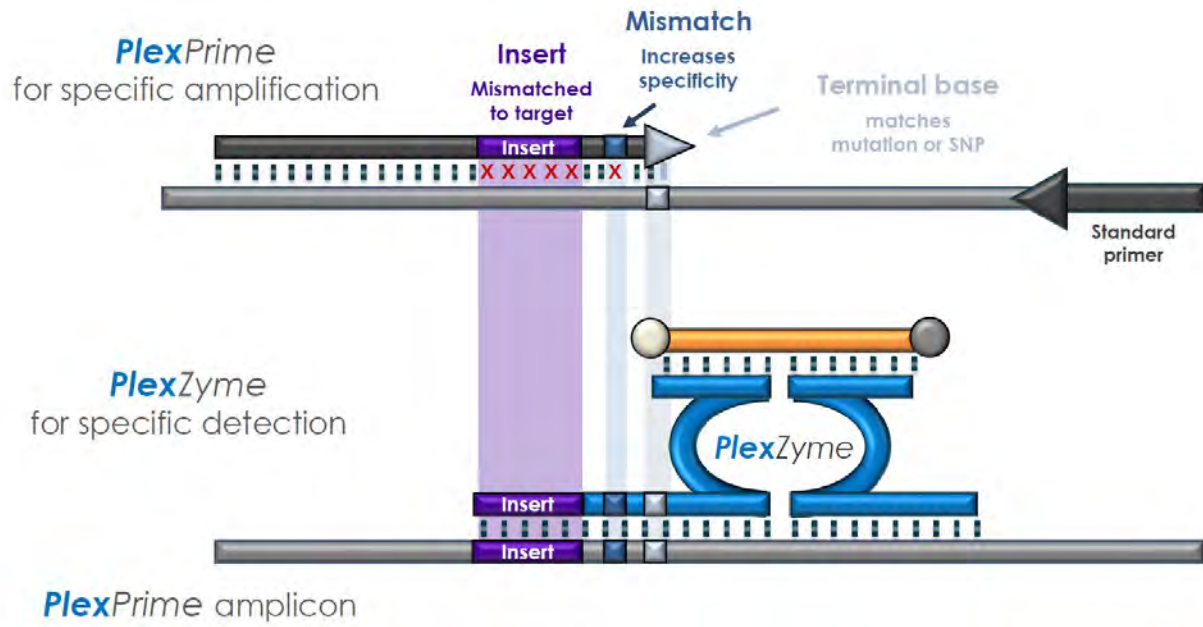
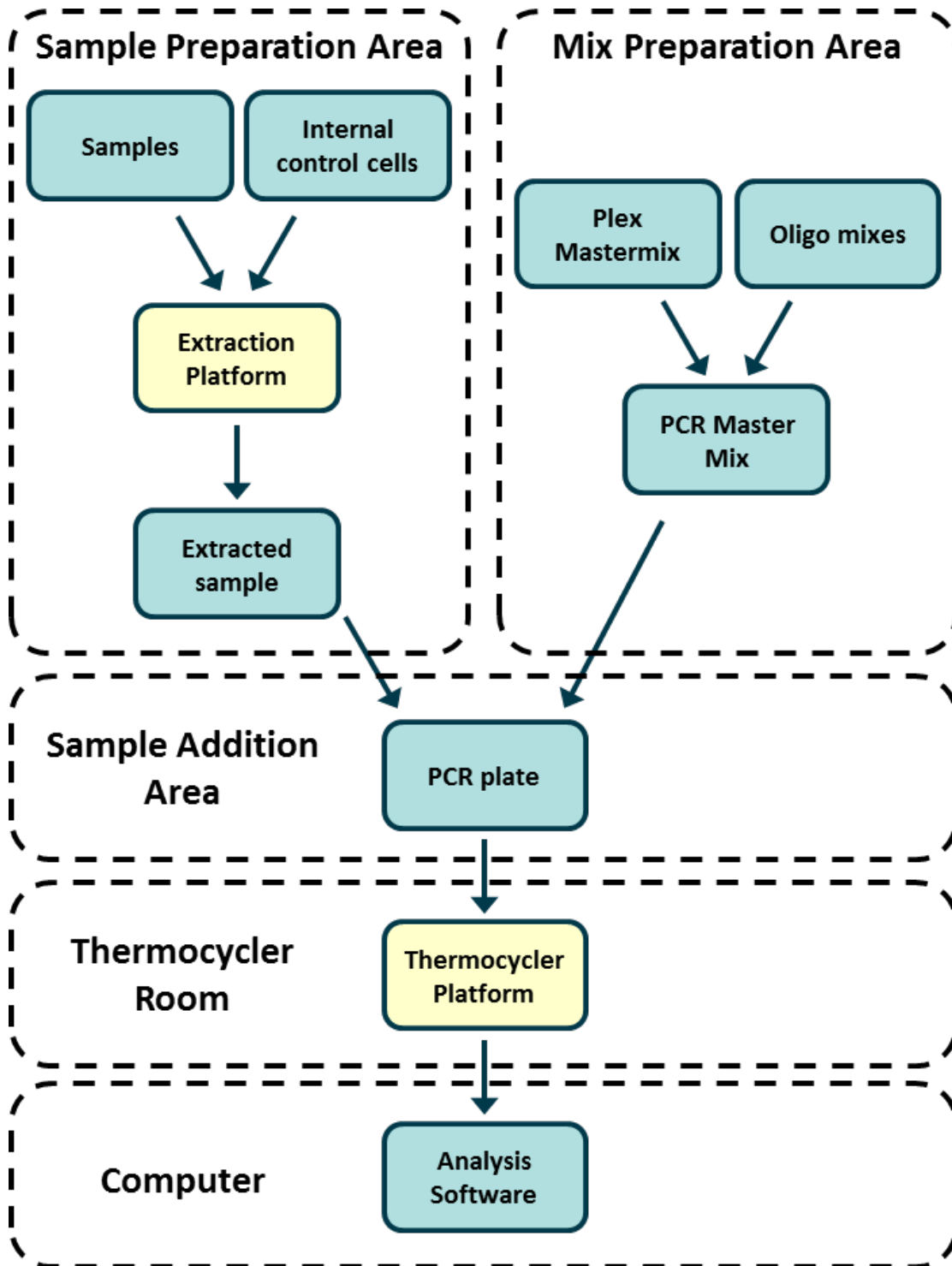


Figure 2. Représentation schématique de l'amorce *PlexPrime*[®] couplée à la détection *PlexZyme*[®]. L'amorce *PlexPrime*[®] amplifie spécifiquement la séquence mutante et les enzymes *PlexZyme*[®] détectent spécifiquement l'amplicon.



10 Vue d'ensemble de la procédure



11 Détails de la procédure

Remarque : les réactifs fournis sont cités en italiques et la couleur du capuchon du tube est indiquée entre parenthèses.

11.1 Prélèvement, transport et stockage des échantillons

L'urine masculine, l'urine féminine et les écouvillons urétraux, anaux, rectaux, pharyngés, péniens, péniens méatiques, cervicaux, endocervicaux et vaginaux, provenant de patients symptomatiques et asymptomatiques, doivent être prélevés, transportés et stockés en utilisant des techniques de laboratoire standard ou conformément aux instructions des kits de prélèvement.

11.1.1 Dispositifs validés de prélèvement d'échantillon

Les méthodes validées de prélèvement d'échantillon incluent :

- Urine non diluée
- Écouvillon sec
- multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott, réf. 9K12-01)
- Aptima® Urine Specimen Collection Kit (Hologic, réf. 301040)
- Aptima® Unisex Swab Specimen Collection Kit (Hologic, réf. 301041)
- DeltaSwab ViCUM® 2 ml + Standard flocked swab (deltalab, réf. 304278)
- Vacumed® Urine without preservative (FL medical, réf. 44950)
- Regular FLOQSwab™ in 1 ml of UTM™ media (Copan réf. 359C)
- cobas® PCR media (Roche, réf. 06466281190)

11.1.2 Extraits d'échantillons validés

Les extraits d'échantillon validés pour utilisation incluent :

- cobas® x480 (du protocole CT/NG)

Voir la **Section 11.5** pour les consignes de préparation de la PCR avec des extraits d'acide nucléique (flux de travail reflex).

11.2 Traitement des échantillons

Le kit **ResistancePlus**® MG a été validé sur les instruments d'extaction suivants, indiqués dans le **Tableau 4**.

Voir la **Section 11.3** pour les consignes d'utilisation de l'Internal Control (Contrôle interne).

Tableau 4. Protocoles d'extraction validés				
Instrument	Kit d'extraction	Volume d'échantillon	Protocole	Volume d'élué
MagNA Pure 96 ^a	MagNA Pure 96 DNA et Viral NA Small Volume Kit	200 µl	Pathogen Universal 200	50 µl ou 100 µl
MagNA Pure 96 ^a	MagNA Pure 96 DNA et Viral NA Large Volume Kit	1000 µl [^]	Viral NA Universal LV 1000 3.1	100 µl
MICROLAB STARlet IVD ^b	STARMag 96 x 4 Universal Cartridge kit (Seegene)	300 µl	10 µl de Internal Control cells (cellules de contrôle interne) diluées ajoutées par échantillon Sélectionner « Pause before PCR setup (Pause avant configuration de la PCR) » pour réaliser l'extraction de l'échantillon uniquement	100 µl
QIAAsymphony SP ^c	DSP Virus/Pathogen Mini Kit	200 µl	Complex200_V6_DSP	110 µl
NucliSENS [®] easyMAG ^{®d}	Réactifs NucliSENS [®] easyMAG [®]	Écouvillon 200 µl	Generic 2.01 ; flux de travail « On-board » (Dans l'instrument)	100 µl
		Urine 1000 µl	Generic 2.01 ; flux de travail « Off-board » (Hors de l'instrument)	100 µl

^a Voir 11.3.1 pour les consignes d'utilisation du contrôle interne sur le MagNA Pure 96

^b Voir 11.3.2 pour les consignes d'utilisation du contrôle interne sur le STARlet IVD

^c Voir 11.3.3 pour les consignes d'utilisation du contrôle interne sur le QIAAsymphony SP

^d Voir 11.3.4 pour les consignes d'utilisation du contrôle interne sur le NucliSENS[®] easyMAG[®]

[^] Augmenter le volume d'échantillon entré pour les échantillons prélevés dans un milieu (p. ex. kits de prélèvement Aptima)

11.2.1 Stockage des échantillons extraits

Stocker les échantillons extraits à -20 °C pendant une durée maximale de 1 mois ou à -70 °C pour un stockage à long terme.

11.3 Internal Control (IC) (Contrôle interne (CI))

Le kit comprend un contrôle interne pour surveiller l'efficacité de l'extraction et l'inhibition de la qPCR. Le test du contrôle interne est fourni sous forme d'un *Control Mix* (mélange de contrôle) (**BLANC**) et de *Internal Control Cells* (cellules de contrôle internes) (**ROUGES**). Le *Control Mix* (mélange de contrôle) est ajouté au PCR Master Mix (mélange de solution mère PCR) (**Tableau 11**). Les *Internal Control cells* (cellules de contrôle interne) contiennent la matrice d'ADN de contrôle interne. Les *Internal Control cells* (cellules de contrôle interne) sont diluées et traitées selon les indications ci-dessous pour les instruments d'extraction spécifiques. La matrice d'ADN de contrôle interne est donc co-extraite avec l'échantillon et co-amplifiée dans la réaction.

11.3.1 Contrôle interne sur le MagNA Pure 96

Diluer les *Internal Control cells* (cellules de contrôle interne) (**ROUGES**) au 1/200 dans du PBS 1x (**Tableau 5**). Ajuster le volume selon les besoins en utilisant le même facteur de dilution (consulter le manuel du kit d'extraction pour le volume minimum pour le nombre requis d'échantillons). Les cellules de contrôle interne diluées sont chargées dans le Internal Control Tube (tube de contrôle interne) sur le MagNA Pure 96 et 20 µl sont automatiquement ajoutés à chaque échantillon (par défaut).

Remarque : NE PAS stocker les Internal Control Cells (cellules de contrôle interne) diluées.

Tableau 5. Dilution des cellules de contrôle interne pour le MagNA Pure 96 (dilution au 1/200)			
<i>Internal Control cells</i> (Cellules de contrôle interne) (ROUGES) (µl)	PBS 1x (µl)	Volume total (µl)	Volume ajouté à l'échantillon (µl)
18	3582	3600	20

11.3.2 Internal Control (Contrôle interne) sur le MICROLAB STARlet IVD

Diluer les *Internal Control cells* (cellules de contrôle interne) (**ROUGES**) au 1/20 dans du PBS 1x (**Tableau 6**). Ajuster le volume selon les besoins en utilisant le même facteur de dilution (consulter le manuel du kit d'extraction pour le volume minimum pour le nombre requis d'échantillons). Les cellules de contrôle interne diluées sont chargées dans un tube de 2 ml et placées sur le portoir à réactifs, et 10 µl sont automatiquement ajoutés à chaque échantillon.

Remarque : NE PAS stocker les Internal Control Cells (cellules de contrôle interne) diluées.

Tableau 6. Dilution des Internal Control cells (cellules de contrôle interne) pour le MICROLAB STARlet IVD (dilution au 1/20)			
Internal Control cells (Cellules de contrôle interne) (ROUGES) (µl)	PBS 1x (µl)	Volume total (µl)	Volume ajouté à l'échantillon (µl)
50	950	1000	10

11.3.3 Contrôle interne sur le QIASymphony® SP

Diluer les *Internal Control cells* (cellules de contrôle interne) (**ROUGES**) au 1/50 dans du PBS 1x (**Tableau 7**). Ajuster le volume comme requis en utilisant le même facteur de dilution conformément au nombre d'échantillons requis.

Remarque : NE PAS stocker les Internal Control Cells (cellules de contrôle interne) diluées.

Tableau 7. Dilution des Internal Control cells (cellules de contrôle interne) pour le QIASymphony® SP (dilution au 1/50)		
Internal Control cells (Cellules de contrôle interne) (ROUGES) (µl)	PBS 1x (µl)	Volume total (µl)
40	1950	2000

Les *Internal Control Cells* (cellules de contrôle interne) diluées sont ensuite utilisées pour préparer un mélange tampon AVE/vecteur ARN/contrôle interne, comme indiqué dans le **Tableau 8** ci-dessous. Ajuster le volume selon les besoins en utilisant le même facteur de dilution pour le nombre d'échantillons requis (consulter le manuel du kit d'extraction pour le volume minimum pour le nombre d'échantillons requis). Le mélange tampon AVE/vecteur ARN/contrôle interne doit être préparé immédiatement avant de commencer la série.

Le mélange tampon AVE/vecteur ARN/contrôle interne est ajouté dans un tube qui est placé dans un porte-tube et chargé dans la fente A du tiroir d'échantillons dans le QIASymphony® SP. 120 µl (par défaut) du mélange sont ajoutés à chaque échantillon.

Tableau 8. Préparation du mélange tampon AVE/vecteur ARN/contrôle interne pour le QIASymphony SP					
Type de tube	Nombre d'échantillons	Volume de cellules de CI diluées (µl)	Vecteur ARN du stock (µl)	Tampon AVE (µl)	Volume total (µl)
-	1	10	3	107	120
2 ml	1 + volume mort [^]	40	12	428	480
14 ml	1 + volume mort [#]	60	18	642	720

[^] Le tube de 2 ml nécessite 3 échantillons supplémentaires (360 µl) pour tenir compte du volume mort.

[#] Le tube de 14 ml nécessite 5 échantillons supplémentaires (600 µl) pour tenir compte du volume mort.

11.3.4 Contrôle interne sur le easyMAG®

Diluer les *Internal Control cells* (cellules de contrôle interne) (**ROUGES**) au 1/200 dans du PBS 1x (**Tableau 9**). Ajuster le volume comme requis en utilisant le même facteur de dilution. Préparer un « pré-mélange » de Internal Control Cells (cellules de contrôle

interne) diluées et de silice magnétique NucliSENS® easyMAG® pour le nombre requis d'échantillons (**Tableau 10**). 100 µl de silice pré-mélangée sont requis par échantillon.

Remarque : NE PAS stocker les Internal Control Cells (cellules de contrôle interne) diluées.

Tableau 9. Dilution des Internal Control cells (cellules de contrôle interne) pour le NucliSENS® easyMAG® (dilution au 1/200)			
Internal Control cells (Cellules de contrôle interne) (ROUGES) (µl)	PBS 1x (µl)	Volume total (µl)	Facteur de dilution
10	1990	2000	200

Tableau 10. Pré-mélange de NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica and diluted Internal Control Cells (silice magnétique et cellules de contrôle interne diluées)			
Nombre d'échantillons	Volume de cellules de CI diluées (µl)	Volume de silice magnétique (µl)	Volume ajouté à l'échantillon (µl)
1	50	50	100

Le flux de travail « On-board » (dans l'instrument) ou celui « Off-board » (hors de l'instrument) sera utilisé en fonction du type d'échantillon. Le flux de travail « Off-board » est utilisé pour la récupération optimale d'acide nucléique des échantillons d'urine. Veuillez consulter le mode d'emploi de NucliSENS® easyMAG® pour plus de renseignements.

Flux de travail « On-board » (écouvillons)

Transférer les échantillons dans le flacon d'échantillon.

Charger les flacons d'échantillon dans l'easyMAG.

Programmer les demandes d'extraction suivantes :

Protocole : Generic 2.0.1 (pour la version logicielle 2.0)

Matrice : autre

Volume (ml) : 0,200

Éluat (µl) : 100 µl

Type : primaire

Après la lyse « on-board », ajouter 100 µl de silice pré-mélangée à chaque échantillon.

Continuer le processus d'extraction.

Flux de travail « Off-board » (urine)

Effectuer un spin en bas court du tube de tampon lyse NucliSENS et ajouter 1000 µl d'urine. Vortexer le tube.

Laisser le mélange reposer à température ambiante pendant 10 minutes.

Après la lyse, transférer les lysats dans les flacons d'échantillon et charger dans l'easyMAG.

Ajouter 100 µl de silice pré-mélangée à chaque échantillon.

Programmer les demandes d'extraction suivantes :

Protocole : Generic 2.0.1 (pour la version logicielle 2.0)

Matrice : autre

Volume (ml) : 1,000

Éluat (µl) : 100 µl

Type : lysé

Continuer le processus d'extraction.

11.4 Préparation de la PCR en temps réel

Remarque : avant d'utiliser les réactifs, les décongeler complètement et les mélanger soigneusement par bref passage au vortex.

Consulter les **Tableaux 1 à 3** pour la description du contenu du kit.

11.4.1 Préparation du mélange de solution-mère

Préparer le mélange de solution-mère comme décrit dans le **Tableau 11**.

Pour un volume réactionnel de 20 µl, 15 µl de mélange de solution-mère et 5 µl d'échantillon sont requis. Pipeter le mélange de solution-mère dans la plaque de PCR puis ajouter l'échantillon extrait à la réaction.

Un contrôle sans matrice (CSM) doit être inclus dans chaque série. Pour la réaction CSM, ajouter de la *Nuclease Free Water* (eau exempte de nucléase) (**NEUTRE**) au lieu de l'échantillon.

Sceller la plaque, la centrifuger et la transférer au thermocycleur.

Tableau 11. Mélange de solution-mère		
Réactif	Concentration	Volume par réaction de 20 µl (µl)
Nuclease Free Water (Eau exempte de nucléase) (NEUTRE)	S.O.	3,0
Mélange de solution-mère Plex (BLEU)	2x	10,0
Mélange MG+23S (MARRON)	20x	1,0
Control Mix (Mélange de contrôle)* (BLANC)	20x	1,0
Volume total (µl)		15,0
Ajouter un échantillon de 5 µl pour un volume final de 20 µl		

* Le Control Mix (mélange de contrôle) inclus dans chaque kit est spécifique à l'instrument de PCR utilisé ; consulter les **Tableaux 1 à 3** pour connaître le Control Mix (mélange de contrôle) adapté à utiliser.

11.4.2 Stabilité du mélange de solution-mère

Le mélange de solution-mère peut être préparé en vrac et stocké à -20°C pendant une durée maximale de 4 semaines ou à 4°C pendant une durée maximale de 1 semaine.

11.5 Préparation de la PCR avec des extraits d'acide nucléique (flux de travail reflex)

Les extraits d'acide nucléique obtenus sans l'ajout d'*Internal Control cells* (cellules de contrôle interne) (**ROUGE**) dans les échantillons peuvent être testés avec le kit **ResistancePlus**® MG.

Cette procédure ne doit être utilisée que pour les extraits qui :

ont été précédemment testés sur une autre plate-forme de test, conformément aux consignes d'utilisation du fabricant, ledit test ayant généré des résultats valides.

Le mélange de solution mère doit être préparé conformément à la **Section 11.4.1**. Pour un test reflex, le contrôle interne n'est pas présent dans l'extrait d'échantillon. Toutefois le mélange de contrôle doit être inclus comme décrit dans la **Section 11.4.1**.

Consulter les **Tableaux 1 à 3** pour la description du contenu du kit.

Préparer le mélange de réaction comme décrit dans le **Tableau 11**. Pour un volume réactionnel de 20 µl, 15 µl de mélange de solution-mère et 5 µl d'échantillon sont requis. Pipeter le mélange de solution-mère dans la plaque de PCR puis ajouter l'échantillon extrait à la réaction.

Un contrôle sans matrice (CSM) doit être inclus dans chaque série. Pour la réaction CSM, ajouter de la *Nuclease Free Water* (eau exempte de nucléase) (**NEUTRE**) au lieu de l'échantillon. Sceller la plaque, la centrifuger et la transférer au thermocycleur.

12 Programmation et analyse

Les **Sections 20 à 24** détaillent la programmation et l'analyse.

Le kit **ResistancePlus[®] MG** utilise trois canaux pour la détection de *M. genitalium*, la mutation de l'ARNr 23S et le contrôle interne (**Tableau 12**).

Le logiciel **ResistancePlus[®] MG** est limité à l'analyse des résultats correspondant aux extraits d'acide nucléique obtenus avec l'ajout d'*Internal Control Cells* (cellules de contrôle interne) (**ROUGES**) dans les échantillons.

Pour les extraits d'acide nucléique obtenus sans l'ajout d'*Internal Control Cells* (**RED**) dans les échantillons, le logiciel REFLEX **ResistancePlus[®] MG** doit être utilisé. Le logiciel REFLEX **ResistancePlus[®] MG** possède deux canaux de détection de *M. genitalium* de mutation de l'ARNr 23S (**Tableau 13**).

Cette procédure ne doit être utilisée que pour les extraits qui :

ont été précédemment testés sur une autre plate-forme de test, conformément aux consignes d'utilisation du fabricant, ledit test ayant généré des résultats valides.

Tableau 12. Canaux pour les cibles ResistancePlus[®] MG			
Instrument	Canal A	Canal B	Canal C
	Détection de <i>M. genitalium</i> (MgPa)	Mutation de l'ARNr 23S	Contrôle interne
LC480 II	465-510	533-580	533-640
z 480	465-510	540-580	540-645
7500 Fast et 7500 Fast Dx	FAM	JOE	TAMRA
CFX96 Dx et CFX Touch	FAM	HEX	Quasar 705

Tableau 13. Canaux pour les cibles de ResistancePlus[®] MG pour le flux de travail reflex		
Instrument	Canal A	Canal B
	Détection de <i>M. genitalium</i> (MgPa)	Mutation de l'ARNr 23S
LC480 II	465-510	533-580
z 480	465-510	540-580
7500 Fast et 7500 Fast Dx	FAM	JOE
CFX96 Dx et CFX Touch	FAM	HEX

13 Interprétation des résultats

L'interprétation des données nécessite le logiciel d'analyse **ResistancePlus[®] MG**. Même si les amorces **PlexPrime[®]** offrent une meilleure spécificité que d'autres amorces spécifiques d'allèle, certaines amplifications non spécifiques du test de mutant de l'ARNr 23S peuvent être identifiables dans des échantillons à concentrations élevées de l'ARNr 23S de type sauvage de *M. genitalium*. Le logiciel d'analyse **ResistancePlus[®] MG** automatise l'interprétation des données des résultats d'amplification et rationalise le flux de travail. Des instructions sur l'utilisation du logiciel d'analyse sont décrites dans la **Section 25**.

Voir le **Tableau 14** pour le logiciel d'analyse approprié pour chaque instrument de PCR en temps réel. Le logiciel d'analyse peut être fourni sur demande. Veuillez contacter tech@speedx.com.au pour plus amples informations.

Tableau 14. Logiciel d'analyse <i>ResistancePlus</i> [®] MG		
Réf.	Logiciel d'analyse*	Instrument de PCR en temps réel
99003	<i>ResistancePlus</i> [®] MG (LC480)	LC480 II
99018	<i>ResistancePlus</i> [®] MG (z 480)	z 480
99002	<i>ResistancePlus</i> [®] MG (7500)	7500 Fast et 7500 Fast Dx
99008	<i>ResistancePlus</i> [®] MG (CFX)	CFX96 Dx et CFX96 Touch
99023	REFLEX <i>ResistancePlus</i> [®] MG (LC480)	LC480 II
99024	REFLEX <i>ResistancePlus</i> [®] MG (z480)	z 480
99026	REFLEX <i>ResistancePlus</i> [®] MG (7500)	7500 Fast et 7500 Fast Dx
99025	REFLEX <i>ResistancePlus</i> [®] MG (CFX)	CFX96 Dx et CFX96 Touch

* Consulter le site Web <https://plexpcr.com/products/sexually-transmitted-infections/resistanceplus-mg/#resources> pour s'assurer d'utiliser la toute dernière version du logiciel d'analyse.

14 Limitations

- Le test *ResistancePlus*[®] MG cible le gène *MgPa* pour *M. genitalium* et les mutations aux positions 2058 et 2059 dans le gène 23S rRNA (A2058G, A2059G, A2058T, A2058C, A2059C, numérotation pour *E. coli*) associées à la résistance à l'azithromycine (antibiotique de la famille des macrolides).
- Le test *ResistancePlus*[®] ne doit être effectué que par du personnel formé et conformément au présent mode d'emploi.
- La fiabilité des résultats dépend du respect des procédures de prélèvement, de transport, de stockage et de traitement des échantillons. Le non-respect des procédures adéquates à chacune de ces étapes risque d'entraîner des résultats erronés.
- Le test *ResistancePlus*[®] est un test qualitatif et ne fournit aucune valeur quantitative ni aucune information à propos de la charge de l'organisme.
- Les résultats du test doivent être corrélés avec l'historique clinique, les données épidémiologiques, les données de laboratoire et toutes les autres données à la disposition du clinicien.
- La prévalence de *M. genitalium* et la résistance aux macrolides affectent les valeurs prédictives positives et négatives du test.
- La détection des marqueurs de résistance aux antibiotiques peut ne pas correspondre à l'expression génétique phénotypique.
- L'échec ou la réussite thérapeutique ne peut pas être déterminé sur la base des résultats du test étant donné que l'acide nucléique peut persister suite à un traitement antimicrobien approprié.
- Les résultats négatifs n'excluent pas la possibilité d'infection imputable à un prélèvement incorrect d'échantillons, une erreur technique, la présence d'inhibiteurs, une confusion d'échantillons ou un faible nombre d'organismes dans l'échantillon clinique.
- Les résultats négatifs pour les marqueurs de résistance n'indiquent pas la susceptibilité des microorganismes détectés, étant donné que des marqueurs de résistance mesurés par le test ou d'autres mécanismes potentiels de résistance aux antibiotiques peuvent être présents.
- Les résultats faussement positifs peuvent survenir suite à une contamination croisée par des organismes cibles, leurs acides nucléiques ou un produit amplifié.

15 Contrôle de qualité

Le kit *ResistancePlus*[®] MG comprend un contrôle interne pour surveiller l'efficacité de l'extraction et l'inhibition de la qPCR (**Section 11.3**).

Lors de l'exécution du test reflex, les cellules de contrôle du kit *ResistancePlus*[®] MG kit n'ont pas été ajoutées au processus d'extraction. Le test reflex ne peut être exécuté que sur des échantillons dont la validité a été établie précédemment par un autre système, garantissant de l'efficacité de l'extraction et l'inhibition qPCR ont été contrôlées.

Le kit *ResistancePlus*[®] MG Positive Control (réf. 95001) est recommandé comme matériel de contrôle positif de l'amplification de l'acide nucléique. Consulter la **Section 16** pour les consignes d'utilisation des contrôles positifs *ResistancePlus*[®] MG. Il est recommandé d'utiliser un échantillon négatif connu comme contrôle négatif.

16 Consignes d'utilisation des contrôles positifs *ResistancePlus*[®] MG

Le kit *ResistancePlus*[®]MG Positive Control contient du matériel de contrôle positif pour les mutants de l'ARNr 23S de *M. genitalium* ainsi qu'un ARNr 23S de type sauvage de *M. genitalium* (**Tableau 15**).

Tableau 15. Contenu du kit <i>ResistancePlus</i> [®] MG Positive Control (contrôle positif, réf. 95001)			
Couleur du capuchon	Contenus	Description	Quantité (10 réactions)
Neutre	MG, ARNr 23S de type sauvage	Matrice de contrôle positif pour la détection de l'ARNr 23S de type sauvage de <i>M. genitalium</i>	1 x 50 µl
Vert	MG, ARNr 23S A2058G	Matrice de contrôle positif pour la détection de la mutation A2059C de l'ARNr 23S de <i>M. genitalium</i> .	1 x 50 µl
Rouge	MG, 23S ARNr A2059G	Matrice de contrôle positif pour la détection de la mutation A2059C de l'ARNr 23S de <i>M. genitalium</i>	1 x 50 µl
Bleu	MG, ARNr 23S A2058T	Matrice de contrôle positif pour la détection de la mutation A2059C de l'ARNr 23S de <i>M. genitalium</i>	1 x 50 µl
Jaune	MG, ARNr 23S A2058C	Matrice de contrôle positif pour la détection de la mutation A2059C de l'ARNr 23S de <i>M. genitalium</i>	1 x 50 µl
Violet	MG, ARNr 23S A2059C	Matrice de contrôle positif pour la détection de la mutation A2059C de l'ARNr 23S de <i>M. genitalium</i>	1 x 50 µl

16.1 Mode d'emploi

Préparer les réactions qPCR conformément à la **Section 11.4** en utilisant le contrôle positif en guise d'échantillon.

L'analyse des données nécessite le logiciel d'analyse *ResistancePlus*[®] MG ; consulter la **Section 25.10** des exemples de résultats.

17 Caractéristiques de performance

17.1 Performance clinique

17.1.1 Étude clinique 1

Une étude clinique prospective-rétrospective a été réalisée au Royal Women's Hospital (RWH), Melbourne, Australie. Les échantillons ont été recueillis entre mai et juin 2016 et d'après les résultats cliniques de laboratoire, 111 échantillons positifs de *M. genitalium* et 100 échantillons négatifs consécutifs de *M. genitalium* ont été sélectionnés pour inclusion dans l'étude. Les 211 échantillons se composaient de 84 échantillons d'urine, 7 écouvillons anaux, 1 écouvillon urogénital (aucun site spécifié (ass)), 1 écouvillon rectal et 1 écouvillon urétral chez les hommes, et de 33 échantillons d'urine, 33 écouvillons cervicaux, 16 écouvillons endocervicaux, 14 écouvillons vaginaux, 13 écouvillons du fond du vagin et 8 écouvillons urogénitaux (ass) chez les femmes. Afin de déterminer la performance du kit **ResistancePlus**[®] MG, la détection de *M. genitalium* a été comparée aux résultats de laboratoire clinique d'un qPCR de l'ARNr bien établi utilisé pour les diagnostics de routine au RWH⁷ et la détection des mutants de l'ARNr 23Sa a été comparée au séquençage de Sanger⁸. Le kit **ResistancePlus**[®] MG a été réalisé sur le LC480 II, après extraction de l'échantillon sur le MagNA Pure 96 Instrument à l'aide du MagNA Pure 96 DNA et le Viral NA Small Volume Kit en suivant le protocole Universal Pathogen 200. Pour la détection de *M. genitalium*, une référence composite a été utilisée pour les échantillons discordants, avec une troisième réaction de qPCR ciblant le gène MgPa⁹. Pour la détection des mutants de l'ARNr 23S, le séquençage de Sanger a été considéré comme le résultat exact. Les résultats corrigés, la sensibilité et la spécificité du kit **ResistancePlus**[®] MG pour la détection de *M. genitalium* et pour la détection des mutants de l'ARNr 23S sont indiqués dans le **Tableau 16**. Deux échantillons ont été exclus car le résultat pour le Internal Control (contrôle interne) n'était pas valide (1 échantillon d'urine féminine et 1 échantillon d'urine masculine). L'analyse de la détection des mutations de l'ARNr 23S inclut uniquement les échantillons où le statut mutant pouvait être déterminé. L'analyse des résultats selon le type de prélèvement est présentée dans le **Tableau 17**. L'analyse des mutations de l'ARNr 23S est présentée dans le **Tableau 18**.

Tableau 16. Évaluation clinique du kit ResistancePlus [®] MG (Étude clinique 1)						
		Détection de <i>M. genitalium</i> qPCR de l'ARNr 16S		Détection des mutants de l'ARNr 23S Séquençage		
		Positif	Négatif		Mutant	Type sauvage
ResistancePlus [®] MG	Positif	106	0	Mutant détecté	68	2
	Négatif	4	99 [^]	Mutant non détecté	2	31
Sensibilité		96,4 % (IC à 95 % 91,0-99,0 %)		Sensibilité		97,1 % (IC à 95 % 90,1-99,7 %)
Spécificité		100,0 % (IC à 95 % 96,3-100,0 %)		Spécificité		93,8 % (IC à 95 % 79,2-99,2 %)

IC à 95 % – intervalle de confiance à 95 % ; Mutant – mutation de l'ARNr 23S aux positions A2058G, A2059G, A2058T, A2058C et A2059C (numérotation pour *E. coli*) ; Type sauvage – absence de mutation à ces positions

[^] Le kit **ResistancePlus**[®] MG kit a détecté 1 vrai négatif pour *M. genitalium* en utilisant une référence composite ; le tableau représente les résultats corrigés.

Tableau 17. Analyse des résultats cliniques selon l'échantillon[^] (Étude clinique 1)

Échantillon	<i>M. M. genitalium</i> prévu négatif	<i>M. genitalium</i> prévu de type sauvage sur l'ARNr 23S	<i>M. genitalium</i> prévu mutant sur l'ARNr 23S
Urine masculine	28/28	8/10 ¹	41/42 ¹
Urine féminine	12/13	11/11	4/6 ²
Écouvillon cervical	21/21	5/5	7/7 ³
Écouvillon endocervical	10/10	3/3	3/3 ⁴
Écouvillon vaginal	8/8	1/1	2/2 ⁵
Écouvillon du fond du vagin	9/9	1/1	4/4 ⁶
Écouvillon anal masculin	3/3	0/0	5/5 ⁷
Écouvillon féminin (ass)	5/5	2/2	1/1 ⁸
Écouvillon masculin (ass)	0/0	0/0	1/1 ⁹
Écouvillon rectal masculin	1/1	0/0	0/0
Écouvillon urétral masculin	1/1	0/0	0/0

Mutant – mutation de l'ARNr 23S aux positions A2058G, A2059G, A2058T, A2058C et A2059C (numérotation pour *E. coli*) ; Type sauvage – absence de mutation à ces positions

[^] 2 échantillons d'urine féminine, 3 échantillons d'urine masculine, 1 écouvillon vaginal exclus à cause d'un échec de séquençage et de l'impossibilité de déterminer le statut mutant.

¹ Urine masculine : 2 *M. genitalium* avec mauvaise attribution de base : *M. genitalium* mutant détecté, 18 A2058G, 20 A2059G, 3 A2058T détectés correctement ; 1 A2058G avec mauvaise attribution de base : *M. genitalium* non détecté

² Urine féminine : 1 A2058G, 3 A2059G détectés correctement ; 2 A2059G avec mauvaise attribution de base : *M. genitalium* détecté, mutant non détecté

³ Écouvillon cervical : 1 A2058G, 6 A2059G correctement détectés

⁴ Écouvillon endocervical : 2 A2059G, 1 A2058T correctement détectés

⁵ Écouvillon vaginal : 3 A2058G, 1 A2059G correctement détectés

⁶ Écouvillon du fond du vagin : 2 A2059G correctement détectés

⁷ Écouvillon anal masculin : 1 A2058G, 3 A2059G, 1 A2058T correctement détectés.

⁸ Écouvillon féminin (aucun site spécifié (ass)) : 1 A2059G correctement détecté

⁹ Écouvillon masculin (aucun site spécifié (ass)) : 1 A2059G correctement détecté

Tableau 18. Analyse des mutations de l'ARNr 23S pour *M. genitalium* (Étude clinique 1)

Résultat de référence [^]	Résultat pour <i>ResistancePlus</i> [®] MG
Type sauvage	31/33 ¹
A2058G	24/25 ²
A2059G	39/41 ³
A2058T	5/5

[^] Pour les échantillons positifs de *M. genitalium* uniquement

¹ Type sauvage : 2 échantillons d'urine masculine avec mauvaise attribution : *M. genitalium* mutant détecté

² A2058G : 1 échantillon d'urine masculine avec mauvaise attribution : *M. genitalium* non détecté

³ A2059G : 2 échantillons d'urine féminine avec mauvaise attribution : *M. genitalium* mutant non détecté

17.1.2 Étude clinique 2

Un sous-ensemble des échantillons extraits de l'étude 1 ont été traités sur le système 7500 Fast. Les résultats ont été comparés au résultat clinique de la qPCR de l'ARNr 16S (Twin 2011) et au séquençage de Sanger (Twin 2012). Les échantillons non concordants de *M. genitalium* ont été testés de nouveau avec la qPCR de l'ARNr 16S (Twin 2011) en raison d'un soupçon de dégradation des échantillons. Les résultats corrigés, la sensibilité et la spécificité du kit **ResistancePlus® MG₍₅₅₀₎** pour la détection de *M. genitalium* et pour la détection des mutants de l'ARNr 23S sont indiqués dans le **Tableau 19**. L'analyse de la détection des mutations de l'ARNr 23S inclut uniquement les échantillons où le statut mutant pouvait être déterminé.

Tableau 19. Évaluation clinique du kit ResistancePlus® MG₍₅₅₀₎ kit (Étude clinique 2)							
		Détection de <i>M. genitalium</i> qPCR de l'ARNr 16S		Détection des mutants de l'ARNr 23S Séquençage			
		Positif	Négatif	Mutant	Type sauvage		
ResistancePlus® MG	Positif	99	0 [^]	Mutant détecté	62		
	Négatif	2	81 [#]	Mutant non détecté	5		
Sensibilité		98,0 % (IC à 95 % 93,0-99,8 %)		Sensibilité		92,5% (IC à 95 % 83,4-97,5 %)	
Spécificité		100,0 % (IC à 95 % 95,6-100,0 %)		Spécificité		100,0 % (IC à 95 % 88,4-100,0 %)	

IC à 95 % – intervalle de confiance à 95 % ; Mutant – mutation de l'ARNr 23S aux positions A2058G, A2059G, A2058T, A2058C et A2059C (numérotation pour *E. coli*) ; Type sauvage – absence de mutation à ces positions

[^] Le kit **ResistancePlus® MG₍₅₅₀₎** a détecté 1 vrai négatif pour *M. genitalium* en utilisant un test de référence ; le tableau représente les résultats corrigés

[#] Le kit **ResistancePlus® MG₍₅₅₀₎** a détecté 10 vrais négatifs pour *M. genitalium* en utilisant un test de référence ; le tableau représente les résultats corrigés.

17.1.3 Étude clinique 3

Une étude clinique rétrospective a été effectuée par Canterbury Health Laboratories (CHL), Christchurch, Nouvelle-Zélande, sur la base d'échantillons caractérisés, archivés datant de 2010-2016, composés de 103 échantillons positifs pour *M. genitalium* et 61 échantillons négatifs pour *M. genitalium*, prélevés avec le multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott). Les 164 échantillons se composaient de 110 échantillons d'urine et de 4 écouvillons rectaux chez les hommes et de 11 échantillons d'urine, 17 écouvillons cervicaux, 15 écouvillons vaginaux, 1 écouvillon urétral, 1 écouvillon urétral/vaginal, 1 écouvillon vaginal/cervical et 4 échantillons prélevés de sites inconnus chez les femmes. Afin de déterminer la performance du kit **ResistancePlus® MG**, la détection de *M. genitalium* a été comparée aux résultats de laboratoire clinique d'un qPCR MgPa bien établi utilisé également pour les diagnostics de routine au CHL (Jensen 2004) et la détection des mutants de l'ARNr 23Sa été comparée au séquençage de Sanger (Jensen 2008). Le kit **ResistancePlus® MG** a été réalisé sur le LC480 II, après extraction de l'échantillon sur le MagNA Pure 96 Instrument à l'aide du MagNA Pure 96 DNA et le Viral NA Small Volume Kit en suivant le protocole Universal Pathogen 200. Pour la détection de *M. genitalium*, le test MgPa de routine a été répété pour les échantillons non concordants. Pour la détection des mutants de l'ARNr 23S, le séquençage de Sanger a été considéré comme le résultat exact. La sensibilité et la spécificité du kit **ResistancePlus® MG** pour la détection de *M. genitalium* et pour la détection des mutants de l'ARNr 23S sont indiquées dans le **Tableau 20**. Cinq échantillons ont été exclus car le résultat pour le Internal Control (contrôle interne) était non valide. L'analyse de la détection des mutations de l'ARNr 23S inclut uniquement les échantillons où le statut mutant pouvait être déterminé. L'analyse des résultats selon le type de prélèvement est présentée dans le **Tableau 21**. L'analyse des mutations de l'ARNr 23S est présentée dans le **Tableau 22**.

Tableau 20. Évaluation clinique du kit <i>ResistancePlus</i> ® MG (Étude clinique 3)						
		Détection de <i>M. genitalium</i> qPCR de l'ARNr 16S		Détection des mutants de l'ARNr 23S Séquençage		
		Positif	Négatif	Mutant	Type sauvage	
<i>ResistancePlus</i> ® MG	Positif	90	0	Mutant détecté	61	1
	Négatif	7	67 [^]	Mutant non détecté	6	22
Sensibilité		92,8 % (95% CI 85,7-97,1 %)		Sensibilité		91,0 % (IC à 95 % 81,5-96,6 %)
Spécificité		100,0 % (IC à 95 % 94,6-100,0 %)		Spécificité		95,6 % (IC à 95 % 79,7-99,9 %)

IC à 95 % – intervalle de confiance à 95 % ; Mutant – mutation de l'ARNr 23S aux positions A2058G, A2059G, A2058T, A2058C et A2059C (numérotation pour *E. coli*) ; Type sauvage – absence de mutation à ces positions

[^] Le kit *ResistancePlus*® MG a détecté 7 vrais négatifs pour *M. genitalium* ; le tableau représente les résultats corrigés.

Tableau 21. Analyse des résultats cliniques selon l'échantillon (Étude clinique 3)			
Échantillon	<i>M. M. genitalium</i> prévu négatif	<i>M. genitalium</i> prévu type sauvage	<i>M. genitalium</i> prévu mutant sur l'ARNr 23S
Urine masculine	45/45	17/18 ¹	38/47 ¹
Urine féminine	4/4	1/1	6/6 ²
Écouvillon cervical	5/5	3/3	8/9 ³
Écouvillon vaginal	6/6	1/1	8/8 ⁴
Écouvillon rectal masculin	3/3	0/0	0/1 ⁵
Échantillon féminin (site inconnu)	1/1	1/1	1/2 ⁶
Écouvillon urétral féminin	1/1	0/0	0/0
Écouvillon urétral/vaginal	1/1	0/0	0/0
Écouvillon vaginal/cervical	1/1	0/0	0/0

Mutant – mutation de l'ARNr 23S aux positions A2058G, A2059G, A2058T, A2058C et A2059C (numérotation pour *E. coli*) ; Type sauvage – absence de mutation à ces positions

¹ Échantillon d'urine masculine : 1 *M. genitalium* avec mauvaise attribution de base : *M. genitalium* mutant détecté, 4 A2058G, 32 A2059G, 1 A2058T, 1 A2058C, 1 A2059C, correctement détectés ; 1 A2058G, 1 A2059G et 1 A2059C avec mauvaise attribution de base *M. genitalium* non détecté 3 A2058G et 2 A2059G avec mauvaise attribution de base : *M. genitalium* mutant non détecté

² Échantillon d'urine féminine : 2 A2058G, 4 A2059G correctement détectés

³ Écouvillon cervical : 3 A2058G, 4 A2059G, 1 A2058C correctement détectés ; 1 A2059G avec mauvaise attribution de base : *M. genitalium* non détecté

⁴ Écouvillon vaginal : 1 A2058G, 7 A2059G correctement détectés

⁵ Écouvillon rectal masculin : 1 A2059G avec mauvaise attribution de base : *M. genitalium* non détecté

⁶ Échantillon féminin (site inconnu) : 1 A2059G correctement détecté ; 1 A2059G avec mauvaise attribution de base : *M. genitalium* mutant non détecté

Tableau 22. Analyse des mutations de l'ARNr 23S pour *M. genitalium* (Étude clinique 3)

Résultat de référence [^]	Résultat pour <i>ResistancePlus</i> [®] MG
Type sauvage	22/23 ¹
A2058G	10/13 ²
A2059G	47/50 ³
A2058T	1/1
A2058C	2/2
A2059C	1/1

[^] Pour les échantillons positifs de *M. genitalium* uniquement

¹ Type sauvage : 2 échantillons d'urine masculine avec mauvaise attribution : *M. genitalium* mutant détecté

² A2058G : 1 échantillon d'urine masculine avec mauvaise attribution : *M. genitalium* mutant non détecté

³ A2059G: 2 échantillons d'urine féminine avec mauvaise attribution : *M. genitalium* mutant non détecté, 1 échantillon féminin (site inconnu) avec mauvaise attribution de base : *M. genitalium* mutant non détecté

17.1.4 Étude clinique 4

Une étude retrospective clinique a été réalisée à l'hôpital universitaire Vall d'Hebron University Hospital (HUVH), de Barcelone, Espagne, pour évaluer la performance du kit *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎ pour la détection de *M. genitalium* et des mutations associées à la résistance à l'azithromycine dans les échantillons rétrospectifs prélevés entre décembre 2017 et avril 2018. Les échantillons comprenaient 92 échantillons positifs pour *M. genitalium* et 108 échantillons consécutifs négatifs pour *M. genitalium* prélevés avec le DeltaSwab ViCUM[®] (Deltalab, Espagne) pour les écouvillons ou Vacumed[®] (FL medical, Italie) pour les échantillons d'urine masculins et féminins. Les 200 échantillons comprenaient 46 échantillons d'urine, 30 écouvillons vaginaux, 30 écouvillons urétraux, 40 écouvillons cervicaux, 8 écouvillons pharyngés et 46 écouvillons rectaux. Des échantillons ont été extraits avec le STARlet IVD (Hamilton) et traités sur l'instrument CFX96 Dx (Bio-Rad). Pour évaluer la performance, la détection de *M. genitalium* a été comparée aux résultats avec Allplex[™] STI Essential (Seegene) ainsi qu'avec le kit *ResistancePlus*[®] MG (SpeedX) sur le LC480 II pour la détection de *M. genitalium* et le statut de l'ARNr 23S. La sensibilité et la spécificité du kit *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎ pour la détection de *M. genitalium* comparée à Allplex[™] STI Essential (Seegene) sont présentées dans le **Tableau 23**. La sensibilité et la spécificité du kit *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎ pour la détection de *M. genitalium* étaient de 100,0 % (IC à 95 % 95,9-100,0 %) et 97,4 % (IC à 95 % 92,4-99,5 %), respectivement et, pour la détection des mutants de l'ARNr 23S, elles étaient comme présentées dans le **Tableau 24**. L'analyse des résultats selon le type de prélèvement est présentée dans le **Tableau 25**.

Tableau 23. Comparaison du kit *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎ avec l'Allplex[™] STI Essential (Étude clinique 4)

		Détection de <i>M. genitalium</i>	
		Allplex [™] STI Essential	
		Positif	Négatif
<i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎	Positif	89	1
	Négatif	3	107
Sensibilité		96,7 % (IC à 95 % 90,8-99,3 %)	
Spécificité		99,1 % (IC à 95 % 94,95-100,0 %)	

Tableau 24. Évaluation clinique du kit *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎ (Étude clinique 4)

		Détection de <i>M. genitalium</i> <i>ResistancePlus</i> [®] MG (LC480 II)		Détection des mutants de l'ARNr 23S [#] <i>ResistancePlus</i> [®] MG (LC480 II)	
		Positif	Négatif	Mutant détecté	Mutant non détecté
<i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎	Positif	87	3	Mutant détecté	42 [^]
	Négatif	0	110	Mutant non détecté	2
Sensibilité		100,0 % (IC à 95 % 95,9-100,0 %)		Sensibilité	
Spécificité		97,4 % (IC à 95 % 92,4-99,5 %)		95,5 % (IC à 95 % 84,5-99,4 %)	
				Spécificité	
				100,0 % (IC à 95 % 91,6-100,0 %)	

IC à 95 % – intervalle de confiance à 95 % ; Mutant – mutation de l'ARNr 23S aux positions A2058G, A2059G, A2058T, A2058C et A2059C (numérotation pour *E. coli*) ; Type sauvage – absence de mutation à ces positions

[^] Le kit *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎ a détecté 1 vrai mutant pour *M. genitalium* en utilisant un test de référence ; le tableau représente les résultats corrigés

^{*} Le kit *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎ a détecté 1 vrai négatif pour *M. genitalium* en utilisant un test de référence ; le tableau représente les résultats corrigés

[#] 1 échantillon a été exclu de l'analyse à cause d'un séquençage mixte de type sauvage-mutant

Tableau 25. Analyse des résultats cliniques selon l'échantillon (Étude clinique 4)

Échantillon	<i>M. genitalium</i> prévu négatif	<i>M. genitalium</i> prévu de type sauvage sur l'ARNr 23S	<i>M. genitalium</i> prévu mutant sur l'ARNr 23S
Urine masculine	26/26	5/5	15/15
Écouvillon urétral masculin	15/15	3/3	11/12 ¹
Écouvillon cervical féminin	16/16	11/11	2/3 ³
Écouvillon vaginal féminin	20/20	15/15	5/5
Écouvillon rectal masculin	19/22 ¹	5/5	8/8
Écouvillon rectal féminin	7/7	3/3	0/0
Écouvillon pharyngé masculin	5/5	0/0	1/1
Écouvillon pharyngé féminin	2/2	0/0	0/0

¹ Écouvillon rectal masculin : 3 *M. genitalium* avec mauvaise attribution de base : positifs pour *M. genitalium*

² Écouvillon urétral masculin : 1 *M. genitalium* mutation de l'ARNr 23S positive avec mauvaise attribution de : *M. genitalium* mutation négative de l'ARNr 23S

³ Écouvillon cervical féminin : 1 *M. genitalium* mutation de l'ARNr positive avec mauvaise attribution de : *M. genitalium* mutation négative de l'ARNr 23S

17.1.5 Étude clinique 5

Une étude clinique rétrospective a été réalisée au Royal Women's Hospital (RWH), Melbourne, Australie en utilisant les échantillons d'urine et d'écouvillons prélevés avec le kit Aptima® entre juin 2017 et novembre 2017. Les échantillons appariés comprenaient 98 échantillons positifs pour *M. genitalium* et 87 échantillons consécutifs négatifs pour *M. genitalium* prélevés sous forme d'urine non diluée (échantillon de routine) ou avec le kit Aptima® Urine Specimen Collection (Hologic), ou sous forme d'écouvillon sec (échantillon de routine) ou avec le kit Aptima® Unisex Swab Specimen Collection (Hologic). Les 185 échantillons comprenaient 122 échantillons d'urine, 18 écouvillons rectaux, 15 écouvillons cervicaux et 25 écouvillons vaginaux. Pour déterminer la performance des échantillons prélevés avec le kit Aptima® avec le kit **ResistancePlus®** MG kit, la détection de *M. genitalium* et des mutants de l'ARNr 23S a été comparée aux résultats de diagnostic clinique obtenus avec le kit **ResistancePlus®** MG (SpeedX) en utilisant l'échantillon de routine. Les tests des échantillons prélevés avec le kit Aptima® ont été réalisés sur le LC480 II, après extraction de l'échantillon à l'aide du MagNA Pure 96 Instrument par le MagNA Pure 96 DNA et du Viral NA Small Volume Kit en suivant le protocole Viral NA Universal LV 1000. Les résultats de diagnostic clinique du RWH, obtenus à partir d'un échantillon diagnostique apparié testé avec le kit **ResistancePlus®** MG (SpeedX), ont été considérés comme le résultat exact pour *M. genitalium*. Pour la détection des mutants de l'ARNr 23S, le résultat a été comparé au résultat diagnostique et au séquençage de Sanger.

La sensibilité et la spécificité du kit **ResistancePlus®** MG pour la détection de *M. genitalium* et pour la détection des mutants de l'ARNr 23S sont indiquées dans le **Tableau 26**. L'analyse de la détection des mutations de l'ARNr 23S inclut uniquement les échantillons où le statut mutant pouvait être déterminé. L'analyse des résultats selon le type de prélèvement est présentée dans le **Tableau 27**.

		Détection de <i>M. genitalium</i> ResistancePlus® MG (échantillon de routine)		Détection des mutants de l'ARNr 23S ResistancePlus® MG (échantillon de routine)		
		Positif	Négatif	Mutant	Type sauvage	
ResistancePlus® MG (avec un échantillon Aptima de 1 ml)	Positif	94	3	Mutant détecté	65	0
	Négatif	4	84	Mutant non détecté	1*	28
Sensibilité		95,9 % (IC à 95 % 89,9-98,9 %)		Sensibilité		98,5 % (IC à 95 % 91,8-100,0 %)
Spécificité		96,6 % (IC à 95 % 90,3-99,3 %)		Spécificité		100,0 % (IC à 95 % 87,7-100,0 %)

* Impossibilité de séquencer l'échantillon

Tableau 27. Analyse des résultats cliniques selon le type d'échantillon (Étude clinique 5)			
Échantillon	<i>M. genitalium</i> prévu négatif	<i>M. genitalium</i> prévu type sauvage	<i>M. genitalium</i> prévu mutant sur l'ARNr 23S
Urine	50/52 ¹	21/22 ¹	45/48 ¹
Écouvillon cervical	11/11	1/1	3/3
Écouvillon vaginal	14/15 ²	3/4 ²	6/6
Écouvillon rectal	9/9	3/3	5/6 ³
Écouvillon anal	0/0	0/0	5/5

Mutant – mutation de l'ARNr 23S aux positions A2058G, A2059G, A2058T, A2058C et A2059C (numérotation pour *E. coli*) ;
Type sauvage – absence de mutation à ces positions

¹ Urine : 2 échantillons négatifs pour *M. genitalium* avec mauvaise attribution de base : *M. genitalium* de type sauvage et mutant respectivement ; 1 échantillon *M. genitalium* de type sauvage avec mauvaise attribution de base : *M. genitalium* négatifs ; 2 échantillons *M. genitalium* mutants avec mauvaise attribution de base : *M. genitalium* de type sauvage, 1 *M. genitalium* mutant avec mauvaise attribution de base *M. genitalium* négatif

² Écouvillon vaginal : 1 *M. genitalium* négatif avec mauvaise attribution de base : *M. genitalium* de type sauvage ; 1 *M. genitalium* de type sauvage avec mauvaise attribution de base : *M. genitalium* négatif

³ Écouvillon rectal : 1 *M. genitalium* mutant avec mauvaise attribution de base *M. genitalium* négatif

17.1.6 Étude clinique 6

Une étude clinique rétrospective a été effectuée à l'University of Queensland Centre for Clinical Research (UQCCR), Australie, en utilisant des extraits cobas® x480 d'urine et d'échantillons d'écouvillon prélevés entre février 2017 et février 2019. Les échantillons comprenaient 85 extraits positifs et 84 extraits négatifs pour *M. genitalium*, originellement prélevés en tant qu'urine non diluée ou avec le cobas® PCR media collection kit (Roche) et extraits sur l'instrument cobas® x480 (cobas® 4800, Roche) en suivant le protocole « full workflow » et « CT/NG » sans ajouter de SpeedX Internal Control Cells (cellules de contrôle interne SpeedX). Les 169 extraits comprenaient 28 écouvillons rectaux, 13 écouvillons vaginaux, 5 écouvillons du fond du vagin, 15 écouvillons cervicaux, 1 écouvillon ectocervical, 5 écouvillons urétraux, 5 écouvillons pharyngés, 1 écouvillon pénien, 1 écouvillon pénien méatique, 1 écouvillon buccal ainsi que 83 échantillons d'urine masculine et 11 échantillons d'urine féminine.

Afin de déterminer la performance des extraits cobas® avec le kit **ResistancePlus®** MG₍₅₅₀₎, la détection de *M. genitalium* a été comparée au résultat de diagnostic de routine (test MgPa PCR (Trembizki *et al.*, 2017)) et la détection des mutants de l'ARNr 23S a été comparée au séquençage de Sanger. Le kit **ResistancePlus®** MG₍₅₅₀₎ a été utilisé sur ABI 7500 Fast Dx. La sensibilité et la spécificité du kit **ResistancePlus®** MG₍₅₅₀₎ pour la détection de *M. genitalium* et pour la détection des mutants de l'ARNr 23S sont indiquées dans le **Tableau 28**. L'analyse de la détection des mutations de l'ARNr 23S inclut uniquement les échantillons où le statut mutant pouvait être déterminé. L'analyse des résultats selon le type de prélèvement est présentée dans le **Tableau 29**. L'analyse des mutations de l'ARNr 23S est présentée dans le **Tableau 30**.

Tableau 28. Évaluation clinique du kit ResistancePlus® MG ₍₅₅₀₎ (Étude clinique 6)						
		Détection de <i>M. genitalium</i> qPCR MgPa		Détection des mutants de l'ARNr 23S Séquençage de Sanger		
		Positif	Négatif	Mutant	Type sauvage	
ResistancePlus® MG ₍₅₅₀₎	Positif	80	0	Mutant détecté	49 [^]	0
	Négatif	5	84	Mutant non détecté	0	25
Sensibilité		94,1 % (IC à 95 % 86,8-98,1 %)		Sensibilité		100,0 % (IC à 95 % 92,8-100,0 %)
Spécificité		100,0 % (IC à 95 % 95,7-100,0 %)		Spécificité		100,0% (IC à 95 % 86,3-100,0 %)

[^] 1 échantillon vaginal a produit un résultat de séquençage mixte type sauvage/A2059G qui a été correctement identifié comme mutant par le test **ResistancePlus®** MG₍₅₅₀₎

Tableau 29. Analyse des résultats cliniques selon l'échantillon (Étude clinique 6) [#]			
Échantillon	<i>M. M. genitalium</i> prévu négatif	<i>M. genitalium</i> prévu de type sauvage sur l'ARNr 23S	<i>M. genitalium</i> prévu mutant sur l'ARNr 23S
Urine masculine	42/42	13/13	26/27 ¹
Urine féminine	6/6	1/1	3/3 ²
Écouvillon cervical	5/5	6/6	2/2 ³
Écouvillon ectocervical	1/1	-	-
Écouvillon vaginal	1/1	1/2	7/7 ⁴
Écouvillon du fond du vagin	2/2	2/2	1/1 ⁵
Écouvillon rectal masculin	17/17	1/1	7/8 ⁶
Écouvillon rectal féminin	1/1	-	-
Écouvillon urétral masculin	3/3	-	2/2 ⁷
Pharyngé masculin	5/5	-	-
Écouvillon pénien	-	1/1	-
Écouvillon pénien méatique	-	-	1/1 ⁸
Écouvillon buccal masculin	1/1	-	-

[#] 6 échantillons ont été exclus car le séquençage a échoué et le vrai statut 23S n'a pas pu être déterminé, à savoir : 2 échantillons cervicaux, 2 échantillons d'urine, 1 échantillon vaginal et 1 échantillon rectal

¹ Échantillons d'urine masculine : 8 A2058G, 3 A2058T et 15 A2059G correctement identifiés ; 1 A2058T a été incorrectement identifié comme : *M. genitalium* non détecté

² Échantillons d'urine féminine : 2 A2058G, 4 A2059G correctement identifiés

³ Écouvillon cervical : 2 A2058G correctement identifiés

⁴ Écouvillon vaginal : 3 A2058G, 2 A2058T et 1 A2059G correctement identifiés ; [^] 1 écouvillon vaginal a été identifié comme mélange WT/A2059G

⁵ Écouvillon du fond du vagin : 1 A2059G correctement identifié

⁶ Écouvillon rectal masculin : 5 A2059G, 1 A2058T et 1 A2058G correctement identifiés ; 1 A2058G a été incorrectement identifié comme : *M. genitalium* non détecté

⁷ Écouvillon urétral masculin : 2 A2059G correctement identifiés

⁸ Écouvillon pénien méatique : 1 A2059G correctement identifié

Tableau 30. Analyse des mutations de l'ARNr 23S pour *M. genitalium* (Étude clinique 6)

Résultat de référence [^]	Résultat pour <i>ResistancePlus</i> [®] MG
Type sauvage	25/26 ¹
A2058G	16/17 ²
A2059G	27/27 ³
A2058T	6/7 ⁴
A2058C	-
A2059C	-

[^]Pour les échantillons positifs de *M. genitalium* uniquement

¹ Type sauvage : 1 écouvillon vaginal avec mauvaise attribution de base : *M. genitalium* non détecté

² A2058G : 1 écouvillon rectal avec mauvaise attribution de base : *M. genitalium* non détecté

³ A2059G : 1 écouvillon vaginal mixte type sauvage/A2059G correctement identifié comme *M. M. genitalium*, mutation de 23S détectée

⁴ A2058T : 1 échantillon d'urine masculine avec mauvaise attribution : *M. genitalium* non détecté

17.1.7 Étude clinique 7

Une étude clinique rétrospective a été effectuée par la Microbiological Diagnostic Unit de la Public Health Unit (MDU), Victoria, Australie, en utilisant des écouvillons secs et de l'urine non diluée, prélevés entre octobre 2018 et janvier 2019. Les échantillons comprenaient 59 extraits positifs et 31 extraits négatifs pour *M. genitalium* y compris 15 écouvillons anaux, 19 écouvillons vaginaux, 2 écouvillons du fond du vagin, 8 écouvillons cervicaux, 1 écouvillon urétral et 45 échantillons d'urine masculine.

Le kit *ResistancePlus*[®] MG a été utilisé sur le LC480 II, après l'extraction d'échantillon sur l'instrument QIA Symphony SP (QIAGEN) à l'aide du kit DSP Virus/Pathogen Mini et en suivant le protocole Complex200_V6_DSP. Les résultats ont été comparés aux résultats de diagnostic de routine obtenus avec le kit *ResistancePlus*[®] MG (SpeedX) en utilisant des échantillons extraits sur l'instrument MagNA Pure 96 (MP96). Pour les résultats non concordants, un test 16S rRNA qPCR (Twin 2011) a été effectué pour la détection de *M. genitalium* et un séquençage de Sanger (Twin 2012) a été effectué pour la détection des mutants sur l'ARNr 23S. La sensibilité et la spécificité du kit *ResistancePlus*[®] MG pour la détection de *M. genitalium* et pour la détection des mutants de l'ARNr 23S sont indiquées dans le **Tableau 31**. L'analyse de la détection des mutations de l'ARNr 23S inclut uniquement les échantillons où le statut mutant pouvait être déterminé. L'analyse des résultats selon le type de prélèvement est présentée dans le **Tableau 32**.

Tableau 31. Évaluation clinique du kit *ResistancePlus*[®] MG (Étude clinique 7)

		Détection de <i>M. genitalium</i> <i>ResistancePlus</i> [®] MG (MP96)		Détection des mutants de l'ARNr 23S <i>ResistancePlus</i> [®] MG (MP96)		
		Positif	Négatif	Mutant	Type sauvage	
<i>ResistancePlus</i> [®] MG (QIA Symphony SP)	Positif	54	0%	Mutant détecté	28	1 [#]
	Négatif	1 [*]	34	Mutant non détecté	1 [#]	22
Sensibilité		98,2 % (IC à 95 % 90,3-100,0 %)		Sensibilité		96,6 % (IC à 95 % 82,2-99,9 %)
Spécificité		100,0 % (IC à 95 % 89,7-100,0 %)		Spécificité		95,7 % (IC à 95 % 78,1-99,9 %)

^{*} Le kit *ResistancePlus*[®] MG a détecté 6 vrais négatifs pour *M. genitalium* qui étaient positifs avec le test de référence ; le tableau représente les résultats corrigés.

[%] Le kit *ResistancePlus*[®] a détecté 7 vrais négatifs pour *M. genitalium* qui étaient négatifs avec le test de référence ; le tableau représente les résultats corrigés.

[#] 2 échantillons d'urine non concordants n'ont pas pu être corrigés à cause de l'échec du séquençage.

Tableau 32. Analyse des résultats cliniques selon l'échantillon (Étude clinique 7) *

Échantillon	<i>M. M. genitalium</i> prévu négatif	<i>M. genitalium</i> prévu de type sauvage sur l'ARNr 23S	<i>M. genitalium</i> prévu mutant sur l'ARNr 23S
Urine masculine	17/17	9/9	12/14 ¹
Urine féminine	1/1	1/2 ²	1/1
Écouvillon cervical	3/3	2/2	3/3
Écouvillon vaginal	8/8 [#]	7/7	3/3
Écouvillon du fond du vagin	1/1	1/1	-
Écouvillon anal masculin	4/4	2/2	8/8
Écouvillon urétral masculin	-	-	1/1

1 écouvillon vaginal a été exclu car il a produit un résultat non valide avec le kit **ResistancePlus**[®] MG

¹ Échantillon d'urine masculine : 1 ARNr 23S de type sauvage de *M. genitalium* a été incorrectement identifié comme : *M. genitalium* non détecté ; 1 mutant de l'ARNr 23S de *M. genitalium* a été incorrectement identifié comme : *M. genitalium* détecté, mutation 23S non détecté

² Échantillons d'urine féminine : 1 incorrectement identifié comme : *M. genitalium* détecté, mutation de l'ARNr 23S détectée

17.2 Performance analytique

17.2.1 Reproductibilité et répétabilité

La reproductibilité et la répétabilité du kit **ResistancePlus**[®] MG avec le LC480 II ont été évaluées en utilisant des matrices synthétiques quantifiées pour *M. genitalium* MgPa et pour les cibles de l'ARNr 23S (A2058G, A2059G, A2058T, A2058C et A2059C) à 10 000 copies par réaction et à 3x la LDD par réaction en utilisant 6 répliques (sauf indication contraire). Les expériences ont été effectuées avec le LC480 II.

Pour déterminer la variabilité inter-lots, deux lots ont été testés, traités sur un seul instrument par un seul technicien (**Tableau 33**). Les deux lots ont montré une bonne reproductibilité avec un coefficient de variation (% CV) compris entre 0,35 % et 2,37 % pour toutes les cibles.

Tableau 33. Variabilité inter-lots				
	Cq moyen	É-T	% CV	Nbre d'échantillons
MgPa 10 000 copies	16,9	0,15	0,89	12/12
MgPa 30 copies	25,5	0,52	2,05	12/12
A2058G 10 000 copies	20,4	0,48	2,37	12/12
A2058G 36 copies	27,8	0,43	1,54	12/12
A2059G 10 000 copies	18,0	0,06	0,35	12/12
A2059G 30 copies	25,6	0,50	1,94	12/12
A2058T 10 000 copies	18,7	0,09	0,46	12/12
A2058T 30 copies	26,2	0,30	1,14	12/12
A2058C 10 000 copies	17,7	0,13	0,75	12/12
A2058C 30 copies	25,4	0,29	1,15	12/12
A2059C 10 000 copies	19,2	0,08	0,42	12/12
A2059C 45 copies	25,0	0,26	1,03	12/12

Pour déterminer la variabilité journalière, les tests ont été effectués sur trois jours par un technicien sur le même instrument (**Tableau 34**). Les trois séries ont montré une bonne reproductibilité entre les différents jours, avec un coefficient de variation compris entre 0,44 % et 2,31 % pour toutes les cibles.

Tableau 34. Variabilité journalière				
	Cq moyen	É-T	% CV	Nbre d'échantillons
MgPa 10 000 copies	17,0	0,18	1,09	18/18
MgPa 30 copies	25,6	0,59	2,31	18/18
A2058G 10 000 copies	20,2	0,37	1,83	18/18
A2058G 36 copies	27,9	0,51	1,84	18/18
A2059G 10 000 copies	18,1	0,24	1,34	18/18
A2059G 30 copies	25,7	0,32	1,23	18/18
A2058T 10 000 copies	18,7	0,23	1,22	18/18
A2058T 30 copies	26,3	0,31	1,17	18/18
A2058C 10 000 copies	17,8	0,16	0,88	18/18
A2058C 30 copies	25,5	0,31	1,22	18/18
A2059C 10 000 copies	19,2	0,08	0,44	18/18
A2059C 45 copies	25,0	0,46	1,82	18/18

Pour déterminer la variabilité inter-séries, trois séries de qPCR ont été comparées, traitées le même jour par le même technicien (**Tableau 35**). Les trois séries ont montré une bonne reproductibilité avec un coefficient de variation compris entre 0,40 % et 3,20 % pour toutes les cibles.

Tableau 35. Variabilité inter-séries				
	Cq moyen	É-T	% CV	Nbre d'échantillons
MgPa 10 000 copies	17,0	0,07	0,40	18/18
MgPa 30 copies	25,7	0,47	1,83	18/18
A2058G 10 000 copies	19,8	0,63	3,20	18/18
A2058G 36 copies	27,5	0,51	1,85	18/18
A2059G 10 000 copies	18,4	0,11	0,61	18/18
A2059G 30 copies	25,7	0,39	1,52	18/18
A2058T 10 000 copies	18,7	0,22	1,18	18/18
A2058T 30 copies	26,4	0,42	1,59	18/18
A2058C 10 000 copies	17,8	0,08	0,46	18/18
A2058C 30 copies	25,5	0,31	1,22	18/18
A2059C 10 000 copies	19,2	0,15	0,76	18/18
A2059C 45 copies	25,2	0,40	1,57	18/18

Pour déterminer la variabilité liée au technicien, deux séries ont été comparées, traitées par deux techniciens (**Tableau 36**). Les deux séries traitées par des techniciens différents ont montré une bonne reproductibilité avec un coefficient de variation compris entre 0,54 % et 1,86 % pour toutes les cibles.

Tableau 36. Variabilité liée au technicien				
	Cq moyen	É-T	% CV	Nbre d'échantillons
MgPa 10 000 copies	16,8	0,12	0,73	12/12
MgPa 30 copies	25,3	0,41	1,61	12/12
A2058G 10 000 copies	20,2	0,24	1,21	12/12
A2058G 36 copies	27,9	0,45	1,62	12/12
A2059G 10 000 copies	17,9	0,10	0,58	12/12
A2059G 30 copies	25,5	0,39	1,53	12/12
A2058T 10 000 copies	18,6	0,10	0,54	12/12
A2058T 30 copies	26,1	0,31	1,20	12/12
A2058C 10 000 copies	17,7	0,13	0,71	12/12
A2058C 30 copies	25,2	0,27	1,06	12/12
A2059C 10 000 copies	19,1	0,16	0,83	12/12
A2059C 45 copies	24,9	0,46	1,86	12/12

Pour déterminer la variabilité liée à l'instrument, deux séries de deux instruments ont été comparées, traitées par le même technicien (**Tableau 37**). Les séries traitées sur des instruments différents ont montré une bonne reproductibilité avec un coefficient de variation compris entre 0,21 % et 2,62 % pour toutes les cibles.

Tableau 37. Variabilité liée à l'instrument				
	Cq moyen	É-T	% CV	Nbre d'échantillons
MgPa 10 000 copies	16,7	0,10	0,60	12/12
MgPa 30 copies	25,4	0,67	2,62	12/12
A2058G 10 000 copies	20,0	0,07	0,33	12/12
A2058G 36 copies	27,8	0,51	1,82	12/12
A2059G 10 000 copies	17,8	0,05	0,30	12/12
A2059G 30 copies	25,3	0,36	1,41	12/12
A2058T 10 000 copies	18,5	0,09	0,50	12/12
A2058T 30 copies	25,9	0,30	1,16	12/12
A2058C 10 000 copies	17,6	0,13	0,75	12/12
A2058C 30 copies	25,3	0,36	1,44	12/12
A2059C 10 000 copies	18,9	0,04	0,21	12/12
A2059C 45 copies	24,8	0,46	1,85	12/12

Pour déterminer la variabilité intra-série, trois expériences ont été comparées, configurées séparément par le même technicien traitant chaque cible sur la même plaque (**Tableau 38**). Les trois expériences ont montré une bonne reproductibilité avec un coefficient de variation compris entre 0,57 % et 3,12 % pour toutes les cibles.

Tableau 38. Variabilité intra-série				
	Cq moyen	É-T	% CV	Nbre d'échantillons
MgPa 10 000 copies	17,3	0,36	2,09	18/18
MgPa 30 copies	25,9	0,81	3,12	18/18
A2058G 10 000 copies	20,2	0,11	0,57	18/18
A2058G 36 copies	28,0	0,65	2,31	18/18
A2059G 10 000 copies	17,9	0,15	0,83	18/18
A2059G 30 copies	25,8	0,38	1,46	18/18
A2058T 10 000 copies	18,8	0,12	0,66	18/18
A2058T 30 copies	26,8	0,38	1,41	18/18
A2058C 10 000 copies	17,8	0,15	0,83	18/18
A2058C 30 copies	25,5	0,36	1,41	18/18
A2059C 10 000 copies	19,0	0,14	0,76	18/18
A2059C 45 copies	25,0	0,42	1,66	18/18

17.2.2 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du kit **ResistancePlus**[®] MG avec le LC480 II a été déterminée en réalisant des dilutions en série limitées à l'aide d'une matrice synthétique quantifiée pour *M. genitalium* MgPa et pour les cibles de l'ARNr 23S (A2058G, A2059G, A2058T, A2058C et A2059C). La sensibilité pour chaque cible a été déterminée comme le nombre de copies par réaction ayant une détection $\geq 95\%$ et est indiquée dans le **Tableau 39**.

Tableau 39. Sensibilité analytique	
	Sensibilité analytique (copies/réaction)
MgPa	10
A2058G	12
A2059G	10
A2058T	10
A2058C	10
A2059C	15

17.2.3 Spécificité analytique

L'étude a été effectuée pour évaluer le kit **ResistancePlus**[®] lorsque des organismes non cibles sont présents avec des concentrations élevées. Un panneau de 65 microorganismes (4 virus, 2 protozoaires, 4 champignons et 55 bactéries) représentant des pathogènes ou une flore courante dans le système urogénital, ou étroitement liés à *M. genitalium*, a été évalué. Chaque souche bactérienne a été testée à 1×10^6 génomes/ml, sauf indication contraire. Les souches virales ont été testées à 1×10^5 génomes/ml, sauf indication contraire. Tous les autres organismes ont été testés en fonction des concentrations mentionnées. Tous les organismes ont été quantifiés en utilisant qPCR, sauf ceux quantifiés comme étant des unités formant colonies (UFC) ou des unités formatrices de plaque (UFP) (**Tableau 40**). Tous les microorganismes ont été testés en triple. Tous les microorganismes testés ont été dilués dans une matrice clinique négative (urine ou écouvillon vaginal).

Les résultats ont montré qu'aucun de ces organismes ont produit des résultats faux positifs dans les matrices négatives de *M. genitalium* (**Tableau 40**).

Une analyse *in silico* a également été effectuée pour évaluer si les oligonucléotides dans le test **ResistancePlus**[®] MG pouvaient amplifier et détecter les séquences d'acides nucléiques à partir d'organismes non cibles disponibles dans BLAST. Aucune interaction significative n'a été détectée.

Tableau 40. Microorganismes testés pour la spécificité analytique

Organisme	Concentration (génomés/ml)	Organisme	Concentration (génomés/ml)	Organisme	Concentration (génomés/ml)
<i>Actinomyces israelii</i>	1 x 10 ⁶	HIV-1 [^]	1 x 10 ³	<i>Mycoplasma pirum</i> (2) [*]	1 x 10 ⁶
<i>Atopobium vaginae</i>	1 x 10 ⁶	HPV type 18 (HeLa cells) [^]	1 x 10 ⁵	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (6) [*]	1 x 10 ⁶
<i>Bacterioides fragilis</i>	1 x 10 ⁶	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma primatum</i>	1 x 10 ⁶
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1 x 10 ⁶	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma salivarium</i>	1 x 10 ⁶
<i>Campylobacter jejuni</i>	1 x 10 ⁶	<i>Lactobacillus crispatus</i>	1 x 10 ⁶	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1 x 10 ⁶
<i>Candida albicans</i>	1 x 10 ⁵	<i>Lactobacillus jensenii</i>	1 x 10 ⁶	<i>Pentatrichomonas hominis</i> [#]	1 x 10 ⁵
<i>Candida glabrata</i>	1 x 10 ⁶	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	1 x 10 ⁶	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1 x 10 ⁶
<i>Candida parapsilosis</i>	1 x 10 ⁶	<i>Listeria monocytogenes</i>	1 x 10 ⁶	<i>Prevotella bivia</i>	1 x 10 ⁶
<i>Candida tropicalis</i>	1 x 10 ⁵	<i>Mobiluncus curtisii</i>	1 x 10 ⁶	<i>Propionibacterium acnes</i>	1 x 10 ⁵
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1 x 10 ⁵	<i>Proteus mirabilis</i>	1 x 10 ⁶
<i>Clostridium perfringens</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma alvi</i>	1 x 10 ⁶	<i>Proteus vulgaris</i>	1 x 10 ⁶
<i>Corynebacterium genitalium</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma amphoriforme</i> (2) [*]	1 x 10 ⁶	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 x 10 ⁶
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma arginini</i>	1 x 10 ⁶	<i>Staphylococcus aureus</i>	1 x 10 ⁶
<i>Enterobacter cloacae</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma buccale</i>	1 x 10 ⁶	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1 x 10 ⁶
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma fermentans</i>	1 x 10 ⁶	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1 x 10 ⁶
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	1 x 10 ⁴	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1 x 10 ⁶
<i>Gardnerella vaginalis</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma hominis</i>	1 x 10 ⁶	<i>Trichomonas vaginalis</i> [#]	1 x 10 ⁵
<i>Haemophilus ducreyi</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma lipophilum</i>	1 x 10 ⁴	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	1 x 10 ⁵
Virus Herpes simplex I	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma orale</i>	1 x 10 ⁶		
Virus Herpes simplex II	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma penetrans</i>	1 x 10 ⁶		

* Le numéro entre parenthèses indique le nombre de souches testées.

[^] quantifié en UFP/ml

[#] quantifié en UFC/ml

17.2.4 Substances potentiellement interférentes

Une étude sur les substances interférentes a été effectuée pour examiner si des substances ou des pathologies éventuellement présentes dans les échantillons d'urine ou d'écouvillon vaginal soient susceptibles d'affecter la performance du test **ResistancePlus**[®] MG. Le panneau comprenait des substances endogènes telles que le sang, la mucine, les leucocytes et les médicaments (sous ordonnance et en vente libre) pouvant être utilisés pour traiter des pathologies urogénitales. Toutes les substances ont été évaluées à travers la performance du contrôle interne, qui surveille l'extraction et l'inhibition de la qPCR. Tous les échantillons de test ont été testés en triple. Les substances ont été diluées dans une matrice clinique négative (soit urine soit écouvillon vaginal), le cas échéant.

Les résultats ont indiqué qu'aucune des substances ou des pathologies ont gêné la détection du contrôle interne ou produit des résultats faux positifs.

La synthèse des résultats est indiquée dans le **Tableau 41** et le **Tableau 42**.

Tableau 41. Substances potentiellement interférentes dans les échantillons d'urine

Classe/substance	Nom du produit	Concentration test
Sang complet	--	1 % v/v
Sperme	--	5,0 % v/v
Mucus	Mucine	0,8 % w/v
Antibiotiques	Azithromycine	1,8 mg/ml
	Doxycycline	3,6 mg/ml
Analgésiques	Aspirine	40 mg/ml
	Paracétamol	3,2 mg/ml
Hormones intravaginales	--	7 mg/ml Progesterone + 0,07 mg/ml Beta Estradiol
Leucocytes	--	10 ⁵ cellules/ml
Albumine	Albumine de sérum bovin	10 mg/ml
Glucose	--	10 mg/ml
Urine acide (pH 4,0)	Urine + N-Acétyle-L-Cystéine	pH 4,0
Urine alcaline (pH 9,0)	Urine + citrate d'ammonium	pH 9,0
Bilirubine	--	1 mg/ml

Tableau 42. Substances potentiellement interférentes dans les échantillons d'écouvillon vaginal

Classe/substance	Nom du produit	Concentration test
Sang	--	60 % v/v
Liquide séminal	--	5,0 % v/v
Mucus	Mucine	0,8 % w/v
Produits vaginaux et contraceptifs en vente libre	Crème anti-démangeaison Vagisil (1,0 once)	0,25 % (w/v)
	Gel K-Y (4,0 onces)	0,25 % (w/v)
	Gel contraceptif vaginal Options Gynol II	0,25 % (w/v)
	Crème vaginale Clotrimazole Walgreens (1,5 once)	0,25 % (w/v)
	Formule peau sensible Vagisil, crème anti-démangeaison force maximale avec de l'avoine (1,0 once)	0,25 % (w/v)
	Gel d'hydratation interne Vagisil ProHydrate Natural Feel (0,2 once x 8 sachets)	0,25 % (w/v)
	Poudre déodorante intime quotidienne Vagisil (8,0 onces)	0,25 % (w/v)
	Douche vaginale médicamenteuse Summer's Eve	0,25 % v/v
Déodorants et talcs	Désodorisant aérosol Summer's Eve (2,0 onces)	0,25 % v/v
Crème pour hémorroïdes	Crème pour hémorroïdes Preparation H (0,9 once)	0,25 % (w/v)
Médicaments sur ordonnance uniquement	Gel vaginal Metronidazole, 0,75 %	0,25 % (w/v)
	Estrace® (crème vaginale à l'œstradiol, USP 0,01 %)	0,25 % (w/v)
Leucocytes	--	10 ⁵ cellules/ml
Hormones intravaginales	--	7 mg/ml Progesterone + 0,07 mg/ml Beta Estradiol

18 Service clients et assistance technique

Contactez l'assistance technique pour toute question relative à la configuration des réactions, aux conditions pour le cyclage et pour les autres demandes.

Tél. : +61 2 9209 4169, E-mail : tech@speedx.com.au

19 Références

1. Taylor-Robinson D, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: from Chrysalis to multicolored butterfly. Clin Microbiol Rev. 2011;24:498–514.
2. Manhart LE, Broad JM, Golden MR. Mycoplasma genitalium: should we treat and how? Clin Infect Dis. 2011 Dec;53 Suppl 3:S129-42.
3. Cazanave C, Manhart LE, Bébéar C. Mycoplasma genitalium, an emerging sexually transmitted pathogen. Med Mal Infect. 2012 Sep;42(9):381-92
4. Jensen JS, Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Hamasuna R. Azithromycin treatment failure in Mycoplasma genitalium-positive patients with nongonococcal urethritis is associated with induced macrolide resistance. Clin Infect Dis. 2008 Dec 15;47(12):1546-53.
5. Jensen JS. Chapter 8: Protocol for the Detection of Mycoplasma genitalium by PCR from Clinical Specimens and Subsequent Detection of Macrolide Resistance-Mediating Mutations in Region V of the 23S rRNA Gene in Diagnosis of Sexually Transmitted Diseases: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 903, Science+Business Media New York 2012.
6. Bissessor M, Tabrizi SN, Twin J, Abdo H, Fairley CK, Chen MY, Vodstrcil LA, Jensen JS, Hocking JS, Garland SM, Bradshaw CS. Macrolide resistance and azithromycin failure in a Mycoplasma genitalium-infected cohort and response of azithromycin failures to alternative antibiotic regimens. Clin Infect Dis. 2015 Apr 15;60(8):1228-36.
7. Twin J, Taylor N, Garland SM, Hocking JS, Walker J, Bradshaw CS, Fairley CK, Tabrizi SN. Comparison of two Mycoplasma genitalium real-time PCR detection methodologies. J Clin Microbiol. 2011 Mar;49(3):1140-2.
8. Twin J, Jensen JS, Bradshaw CS, et al. Transmission and selection of macrolide resistant Mycoplasma genitalium infections detected by rapid high resolution melt analysis. PLoS One 2012; 7:e35593.
9. Jensen JS, Bjornelius E, Dohn B, Lidbrink P. Use of Taqman 5' nuclease real-time PCR for quantitative detection of Mycoplasma genitalium DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually transmitted disease clinic. J Clin Microbiol. 2004 42:683-692.

20 Annexe 1 : LightCycler® 480 instrument II

Les informations suivantes sont basées sur le logiciel LightCycler® 480 (version 1.5).

Le kit **ResistancePlus**® MG contient des colorants pour le LightCycler® 480 Instrument II. Le kit **PlexPCR**® Colour Compensation (réf. 90001) doit être traité et appliqué pour l'analyse LC480 II (voir la **Section 20.2**). Ce kit peut être fourni sur demande.

20.1 Programmation du LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II)

Format de détection

Créer un Format de **détection personnalisé**

Ouvrir **Tools (Outils) > Detection Formats (Formats de détection)**

Créer un nouveau format de détection et le nommer « **SpeedX PlexPCR** » (peut être accompli durant la création du fichier SpeedX Colour Compensation [Compensation de couleur]) (voir la **Figure 3**).

Pour **Filter Combination Selection** (Sélection de combinaisons de filtres), sélectionner les plages suivantes (excitation-émission) :

Tableau 43. Combinaisons de filtres [^]						
LC480 II	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660

[^] Ces combinaisons de filtres sont les noms par défaut des canaux

Régler **Selected Filter Combination List** (Liste des combinaisons de filtres sélectionnées) pour tous les canaux comme suit :

Melt Factor (Facteur de fusion) : 1

Quant Factor (Facteur de quantification) : 10

Max Integration Time (sec) (Temps d'intégration max (s)) : 1

Figure 3. Format de détection SpeedX personnalisé

Filter Combination Selection							
		Emission					
Excitation		488	510	580	610	640	660
	440	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	465	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	498	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	533	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	618	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Selected Filter Combination List					
Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time (Sec)
440	488	440-488	1	10	1
465	510	465-510	1	10	1
533	580	533-580	1	10	1
533	610	533-610	1	10	1
533	640	533-640	1	10	1
618	660	618-660	1	10	1

Paramètres de l'instrument

Créer un Format de **détection personnalisé**

Ouvrir **Tools (Ouvrir Outils) > Instruments**

Sous **Instrument Settings** (Paramètres de l'instrument) > sélectionner **Barcode Enabled**(Code-barre activé)

Configuration expérimentale

Sélectionner **New Experiment** (Nouvelle expérience)

Dans l'onglet **Run Protocol** (Protocole de la série)

Sous **Detection Format** (Format de détection), sélectionner le « **SpeedX PlexPCR** » personnalisé (**Figure 4**)

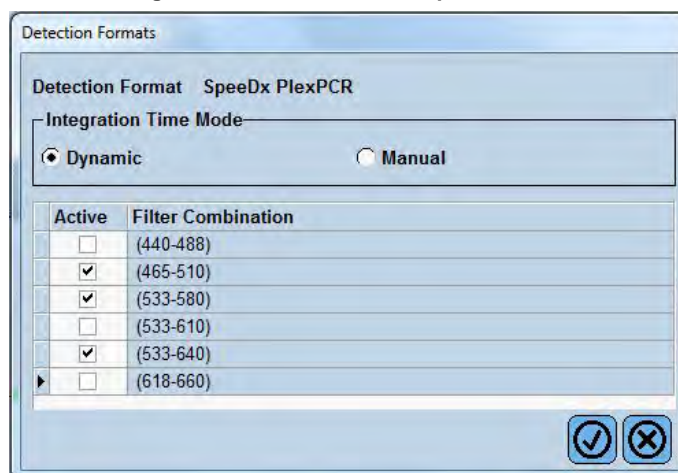
Sélectionner **Customize** (Personnaliser) >

Sélectionner **Integration Time Mode** > **Dynamic** (Mode Temps d'intégration > Dynamique)

Sélectionner les **Filter Combinations** (Combinaisons de filtres) actives, indiquées dans le **Tableau 44**

Tableau 44. Canaux pour les cibles <i>ResistancePlus</i> ® MG		
Détection de <i>M. genitalium</i> (MgPa)	Mutation de l'ARNr 23S	Contrôle interne
465-510	533-580	533-640

Figure 4. Format de détection personnalisé



Pour permettre la détection automatisée de l'échantillon dans le logiciel d'analyse, assigner des étiquettes d'identification aux puits sur la plaque

Ouvrir le module **Sample Editor** (Éditeur d'échantillon)

Sélectionner le puits













Modifier le **Sample Name** (Nom de l'échantillon) pour qu'il corresponde à l'étiquette d'identification définie dans le module de tests du logiciel d'analyse (voir la **Section 25.3**)

Les échantillons sont étiquetés sous la forme *Préfixe_Suffixe* (comme présenté dans le **Tableau 45** et la **Figure 5**) p. ex. Pa_MG

REMARQUE : les étiquettes d'identification des échantillons sont sensibles à la casse. L'étiquette d'identification doit correspondre exactement à celle assignée dans le fichier de série.

Tableau 45. Étiquettes d'identification d'échantillon pour le logiciel d'analyse			
Type d'échantillon	Préfixe (dans le logiciel d'analyse)	_Suffixe (dans le logiciel d'analyse)	Dénomination de l'échantillon (dans LC480)
Échantillon classique	S	_MG	S_MG
Contrôle négatif	N	_MG	N_MG
Contrôle positif (MG, ARNr 23S de type mutant) (Pa)	Pa	_MG	Pa_MG
Contrôle positif (MG, ARNr 23S de type sauvage) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG

Figure 5. Éditeur d'échantillon – Assignment d'étiquettes d'identification aux puits

Pos	Filter combination	Color	Repl Of	Sample Name
A12	465-510 (465-510)			S_MG
A12	533-580 (533-580)			S_MG
A12	533-640 (533-640)			S_MG
B12	465-510 (465-510)			Pa_MG
B12	533-580 (533-580)			Pa_MG
B12	533-640 (533-640)			Pa_MG
C12	465-510 (465-510)			Pb_MG
C12	533-580 (533-580)			Pb_MG
C12	533-640 (533-640)			Pb_MG
G8	465-510 (465-510)			N_MG
G8	533-580 (533-580)			N_MG
G8	533-640 (533-640)			N_MG

Régler **Reaction Volume** (Volume réactionnel) > 20 µl

Créer le programme suivant (présenté de manière plus détaillée de la **Figure 6** à la **Figure 9**) :

Tableau 46. Thermocycling Program (Programme de thermocyclage)				
Program name (Nom du programme)	Cycles	Target °C (Cible °C)	Hold (Temps d'arrêt)	Ramp Rate (Vitesse de rampe) (°C/s) [‡]
Polymerase activation (Activation de la polymérase)	1	95 °C	2 min	4,4
Touch down cycling (Cyclage Touchdown) [§] : Step down (Cyclage par essais : Incrément) -0,5° C/cycle	10	95 °C	5 s	4,4
		61°C – 56,5°C [§]	30 s	2,2
Quantification cycling (Cyclage par quantification) [†] : Acquisition/Detection (Acquisition/Détection)	40	95°C	5 s	4,4
		52°C [†]	40 s	2,2
Cooling (Refroidissement)	1	40°C	30 s	2,2

[‡] Vitesse de rampe par défaut (plaque 96 puits)

[§] **Step size (incrément)** : -0.5° C/Cycle, **Sec Target (Cible s)** : 56° C

[†] **Analysis mode (Mode d'analyse)** : Quantification, **Acquisition mode** (Mode d'acquisition) : Single (Simple)

Figure 6. Programme de thermocyclage – Activation de la polymérase

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Polymerase activation	1	None
Touchdown cycling	10	None
Quantification cycling	40	Quantification
Cooling	1	None

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:02:00	4.4	0	0	0	0

Figure 7. Programme de thermocyclage – Cyclage par essais

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Polymerase activation	1	None
Touchdown cycling	10	None
Quantification cycling	40	Quantification
Cooling	1	None

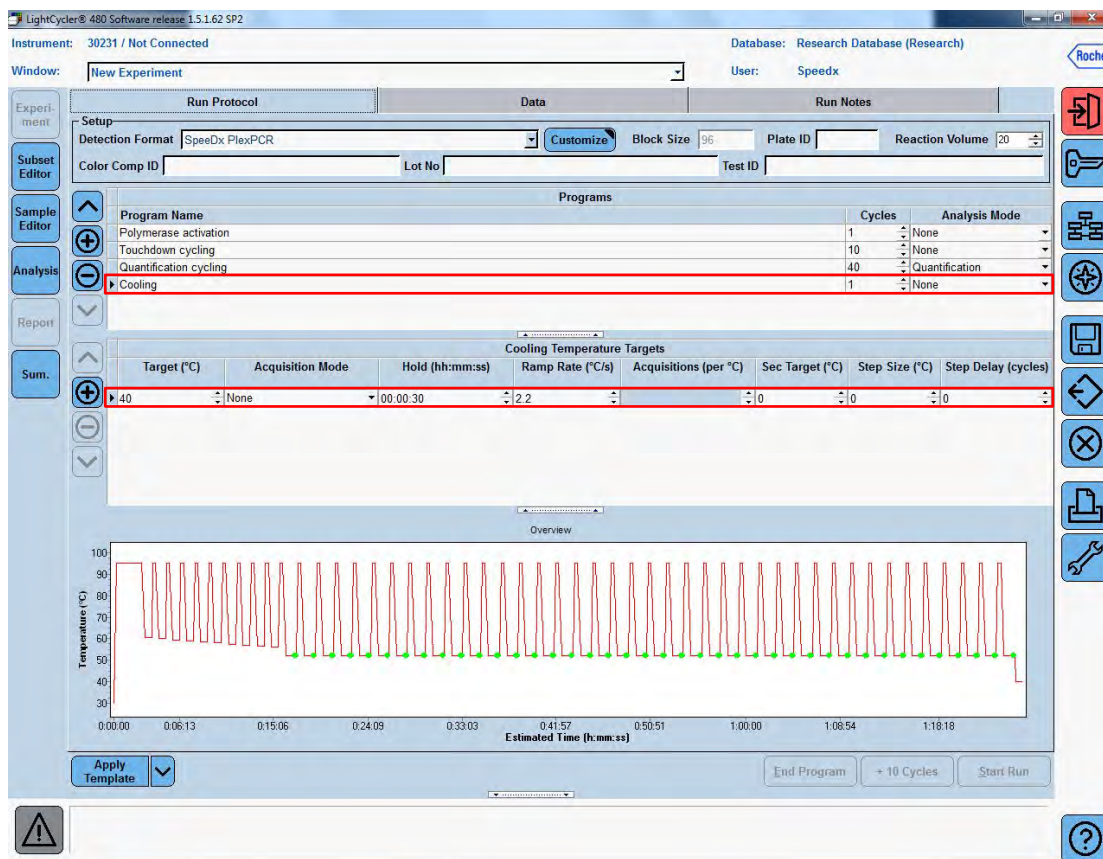
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.4	0	0	0	0
61	None	00:00:30	2.2	0	0.5	0	0

Figure 8. Programme de thermocyclage – Cyclage par quantification

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Polymerase activation	1	None
Touchdown cycling	10	None
Quantification cycling	40	Quantification
Cooling	1	None

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.4	0	0	0	0
52	Single	00:00:40	2.2	0	0	0	0

Figure 9. Programme de thermocyclage – Refroidissement



> **Start Run** (Lancer la série)

Une fois le programme de cyclage terminé, exporter un fichier .IXO dans le logiciel d'analyse **ResistancePlus®** MG (LC480) pour analyse.

Sélectionner **Export** (Exporter)

Enregistrer dans un emplacement facilement identifiable.

20.2 Colour Compensation (Compensation de couleur) pour LightCycler® 480 Instrument II

REMARQUE : le kit **PlexPCR®** Colour Compensation (Compensation de couleur) (réf. 90001) doit être traité et appliqué pour l'analyse de LC480 II. Ce kit peut être fourni sur demande.

Pour une analyse avec le logiciel, le nom de l'échantillon des réactions de compensation de couleur doit être marqué comme indiqué dans le **Tableau 47**.

Une fois le programme de cyclage terminé, exporter un fichier .IXO dans le logiciel d'analyse **ResistancePlus®** MG (LC480) pour analyse.

Sélectionner **Export** (Exporter)

Enregistrer dans un emplacement facilement identifiable sous le nom « **SpeedX PlexPCR** »

Tableau 47. Nom de l'échantillon pour les réactions de compensation de couleur pour le logiciel d'analyse

Réactions							
	BLANC	488 mix (Mélange 488)	Mélange 510	580 mix (Mélange 580)	610 mix (Mélange 610)	640 mix (Mélange 640)	660 mix (Mélange 660)
Canal dominant	Eau	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660
Nom de l'échantillon	BLANC	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660

20.3 Interprétation des résultats

L'interprétation des données nécessite le logiciel d'analyse **ResistancePlus®** MG (LC480). Le logiciel d'analyse peut être fourni sur demande. Contacter tech@speedx.com.au pour de plus amples informations.

Consulter la **Section 25** pour obtenir les instructions d'utilisation du logiciel d'analyse **ResistancePlus®** MG (LC480)..

21 Annexe 2 : analyseur cobas z 480

Les informations suivantes sont basées sur le logiciel de l'analyseur cobas z 480 (LightCycler 480 SW UDF 2.1.0). Adressez-vous à votre représentant Roche pour accéder au logiciel UDF sur votre analyseur cobas z 480.

Le kit **ResistancePlus**® MG contient les colorants pour l'analyseur cobas z 480. Le kit **PlexPCR**® Colour Compensation (réf 90001) doit être traité et appliqué pour l'analyse z 480 (voir la **Section 21.2**). Ce kit peut être fourni sur demande.

21.1 Programmation de l'analyseur cobas z 480

Format de détection

Créer un Format de **détection personnalisé**

Ouvrir **Tools (Outils) > Detection Formats (Formats de détection)**

Créer un New Detection Format (nouveau format de détection) et le nommer « **SpeedX PlexPCR** » [peut être accompli durant la création du fichier SpeedX Colour Compensation (Compensation de couleur)] (voir la **Figure 10**).

Pour **Filter Combination Selection** (Sélection de combinaisons de filtres), sélectionner les plages suivantes (excitation-émission) :

Tableau 48. Combinaisons de filtres [^]					
z 480	465-510	540-580	540-610	540-645	610-670

[^] Ces combinaisons de filtres sont les noms par défaut des canaux

Régler **Selected Filter Combination List** (Liste des combinaisons de filtres sélectionnées) pour tous les canaux comme suit :

Melt Factor (Facteur de fusion) : 1

Quant Factor (Facteur de quantification) : 10

Max Integration Time (sec) (Temps d'intégration max (s)) : 1

Figure 10. Format de détection SpeedX personnalisé

Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time (Sec)
465	510	465-510	1	10	1
540	580	540-580	1	10	1
540	610	540-610	1	10	1
540	645	540-645	1	10	1
610	670	610-670	1	10	1

Paramètres de l'instrument

Créer un Format de **détection personnalisé**

Ouvrir **Tools (Ouvrir Outils) > Instruments**

Sous **Instrument Settings** (Paramètres de l'instrument) > sélectionner **Barcode Enabled**(Code-barre activé)

Configuration expérimentale

Sélectionner **New Experiment** (Nouvelle expérience)

Dans l'onglet **Run Protocol** (Protocole de la série)

Sous **Detection Format** (Format de détection), sélectionner le « **SpeedX PlexPCR** » personnalisé (**Figure 11**)

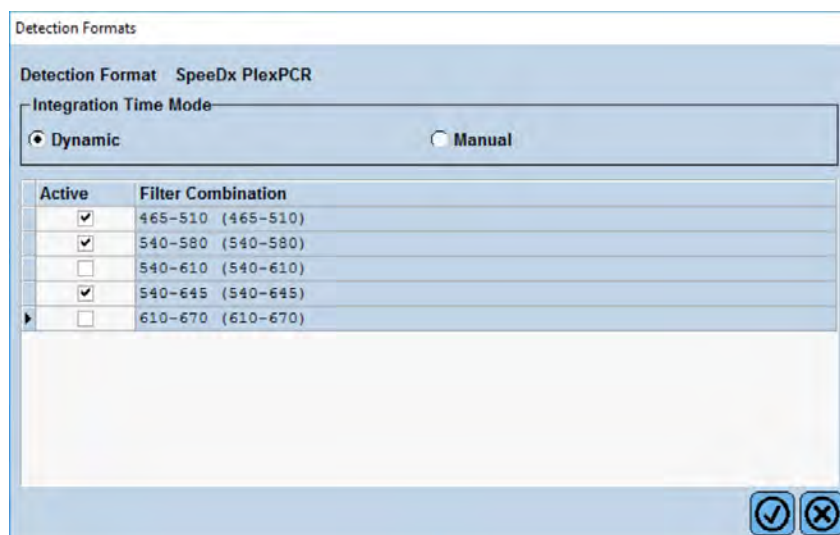
Sélectionner **Customize** (Personnaliser) >

Sélectionner **Integration Time Mode > Dynamic** (Mode Temps d'intégration > Dynamique)

Sélectionner les **Filter Combinations** (Combinaisons de filtres) actives, indiquées dans le **Tableau 49**

Détection de <i>M. genitalium</i> (MgPa)	Mutation de l'ARNr 23S	Contrôle interne
465-510	540-580	540-645

Figure 11. Format de détection personnalisé



Pour permettre la détection automatisée de l'échantillon dans le logiciel d'analyse, assigner des étiquettes d'identification aux puits sur la plaque

Ouvrir le module **Sample Editor** (Éditeur d'échantillon)

Sélectionner le puits

Modifier le **Sample Name** (Nom de l'échantillon) pour qu'il corresponde à l'étiquette d'identification définie dans le module de tests du logiciel d'analyse (voir la **Section 25.3**)

Les échantillons sont étiquetés sous la forme *Prefixe_Suffixe* (comme présenté dans le **Tableau 50** et la **Figure 12**) p. ex. Pa_MG

REMARQUE : les étiquettes d'identification des échantillons sont sensibles à la casse. L'étiquette d'identification doit correspondre exactement à celle assignée dans le fichier de série.

Tableau 50. Étiquettes d'identification d'échantillon pour le logiciel d'analyse			
Type d'échantillon	Préfixe (dans le logiciel d'analyse)	_Suffixe (dans le logiciel d'analyse)	Dénomination de l'échantillon (dans z 480)
Échantillon classique	S	_MG	S_MG
Contrôle négatif	N	_MG	N_MG
Contrôle positif (MG, ARNr 23S de type mutant) (Pa)	Pa	_MG	Pa_MG
Contrôle positif (MG, ARNr 23S de type sauvage) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG

Figure 12. Éditeur d'échantillon – Assignment d'étiquettes d'identification aux puits

Pos	Filter combination	Color	Repl Of	Sample Name	Quantification Sample Type
A12	465–510 (465)	Blue		S_MG	Unknown
A12	540–580 (540)	Blue		S_MG	Unknown
A12	540–645 (540)	Blue		S_MG	Unknown
B12	465–510 (465)	Red		Pa_MG	Unknown
B12	540–580 (540)	Red		Pa_MG	Unknown
B12	540–645 (540)	Red		Pa_MG	Unknown
C12	465–510 (465)	Green		Pb_MG	Unknown
C12	540–580 (540)	Green		Pb_MG	Unknown
C12	540–645 (540)	Green		Pb_MG	Unknown
D12	465–510 (465)	Orange		N_MG	Unknown
D12	540–580 (540)	Orange		N_MG	Unknown
D12	540–645 (540)	Orange		N_MG	Unknown

Régler **Reaction Volume** (Volume réactionnel) > 20 µl

Créer le programme suivant (présenté de manière plus détaillée de la **Figure 13** à la **Figure 16**) :

Tableau 51. Thermocycling Program (Programme de thermocyclage)				
Program name (Nom du programme)	Cycles	Target °C (Cible °C)	Hold (Temps d'arrêt)	Ramp Rate (Vitesse de rampe) (°C/s) [*]
Polymerase activation (Activation de la polymérase)	1	95° C	2 min	4,4
Touch down cycling (Cyclage Touchdown) ^o : Step down (Cyclage par essais : Incrément) -0,5° C/cycle	10	95 °C	5 s	4,4
		61°C – 56,5°C ^o	30 s	2,2
Quantification cycling (Cyclage par quantification) ^{*:} Acquisition/Detection (Acquisition/Détection)	40	95 °C	5 s	4,4
		52°C ⁺	40 s	2,2
Cooling (Refroidissement)	1	40°C	30 s	2,2

^{*} Vitesse de rampe par défaut (plaque 96 puits)

^o **Step size (incrément)** : -0,5°C/Cycle, **Sec Target (cycle s)** : 56°C

⁺ **Analysis mode (Mode d'analyse)** : Quantification, **Acquisition mode (Mode d'acquisition)** : Single (Simple)

Figure 13. Programme de thermocyclage – Activation de la polymérase

The screenshot shows the 'Programs' table with the following data:

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Polymerase activation	1	None
Touchdown cycling	10	None
Quantification cycling	40	Quantification
Cooling	1	None

The 'Polymerase activation Temperature Targets' table is also visible:

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:02:00	4.4	0	0	0	0

Figure 14. Programme de thermocyclage – Cyclage par essais

The screenshot shows the 'Programs' table with the following data:

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Polymerase activation	1	None
Touchdown cycling	10	None
Quantification cycling	40	Quantification
Cooling	1	None

The 'Touchdown cycling Temperature Targets' table is also visible:

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.4	0	0	0	0
61	None	00:00:30	2.2	56	0.5	0	0

Figure 15. Programme de thermocyclage – Cyclage par quantification

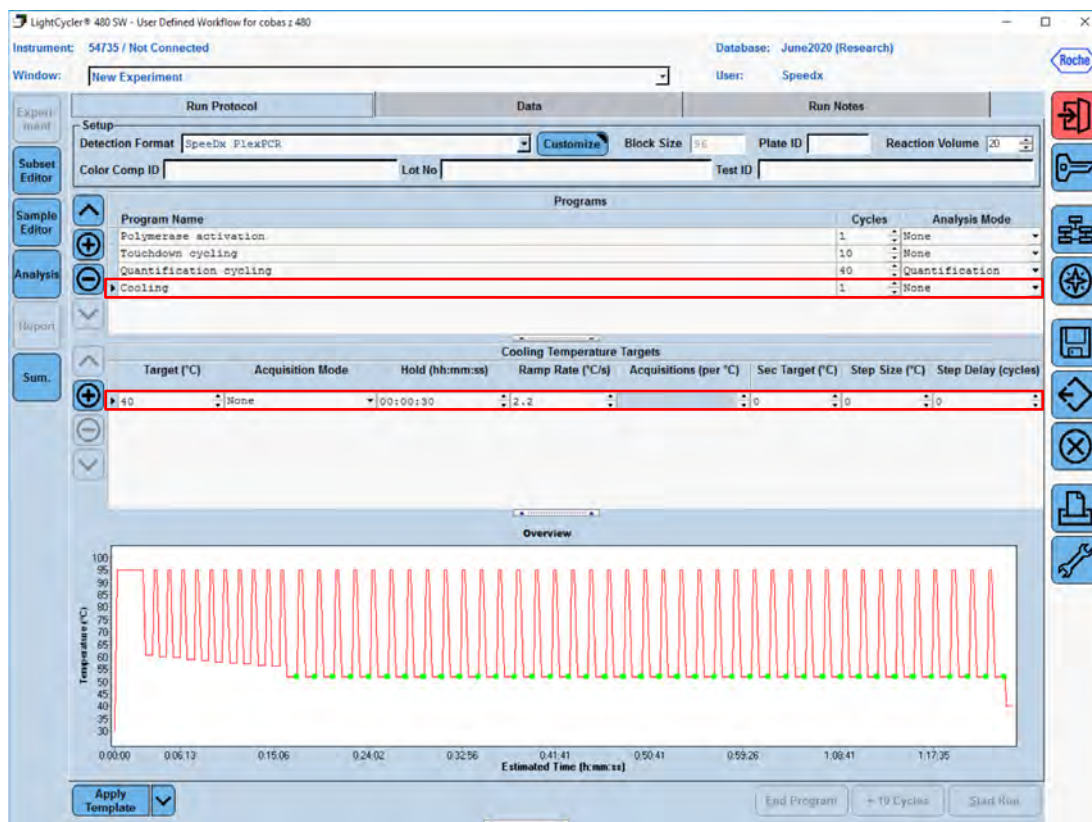
The screenshot shows the 'Programs' table with the following data:

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Polymerase activation	1	None
Touchdown cycling	10	None
Quantification cycling	40	Quantification
Cooling	1	None

The 'Quantification cycling Temperature Targets' table is also visible:

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.4	0	0	0	0
52	Single	00:00:40	2.2	0	0	0	0

Figure 16. Programme de thermocyclage – Refroidissement



> **Start Run** (Lancer la série)

Une fois le programme de cyclage terminé, exporter un fichier .IXO dans le logiciel d'analyse **ResistancePlus®** MG (z480) .

Sélectionner **Export** (Exporter)

Enregistrer dans un emplacement facilement identifiable.

21.2 Colour Compensation (compensation de couleur) pour l'analyseur cobas z 480

REMARQUE : le kit **PlexPCR®** Colour Compensation (Compensation de couleur) (réf. 90001) doit être traité et appliqué pour l'analyse z480. Ce kit peut être fourni sur demande.

Pour une analyse avec le logiciel, le nom de l'échantillon des réactions de compensation de couleur doit être marqué comme indiqué dans le **Tableau 52**.

Une fois le programme de cyclage terminé, exporter un fichier .IXO dans le logiciel d'analyse **ResistancePlus®** MG (z480) .

Sélectionner **Export** (Exporter)

Enregistrer dans un emplacement facilement identifiable sous le nom « **SpeedX PlexPCR** »

Tableau 52. Nom de l'échantillon pour les réactions de compensation de couleur pour le logiciel d'analyse						
Réactions						
	BLANC	Mélange 510	580 mix (Mélange 580)	610 mix (Mélange 610)	640 mix (Mélange 640)	660 mix (Mélange 660)
Canal dominant	Eau	465-510	540-580	540-610	540-645	610-670
Nom de l'échantillon	BLANC	465-510	540-580	540-610	540-645	610-670

21.3 Interprétation des résultats

L'interprétation des données nécessite le logiciel d'analyse **ResistancePlus**[®] MG (z480). Le logiciel d'analyse peut être fourni sur demande. Contacter tech@speedx.com.au pour de plus amples informations.

Consulter la **Section 25** pour obtenir les instructions d'utilisation du logiciel d'analyse **ResistancePlus**[®] MG (z480) .

22 Annexe 3 : Applied Biosystems® 7500 Fast

Les informations suivantes sont basées sur le 7500 Software v2.3.

Le kit **ResistancePlus®** MG₍₅₅₀₎ contient les colorants pour le système Applied Biosystems® (ABI) 7500 Fast. Les étalonnages de coloration par défaut sont utilisés pour tous les canaux. Aucun étalonnage personnalisé n'est requis.

22.1 Programmation du système Applied Biosystems® 7500 Fast

Sélectionner **Advanced Setup** (Configuration avancée)

Dans **Setup** (Configuration) > ouvrir **Experiment Properties** (Propriétés de l'expérience) et sélectionner les options suivantes

Nommer l'expérience

Instrument > 7500 Fast (96 puits)

Type of experiment (Type d'expérience) > Quantitation – Standard Curve (Analyse quantitative - Courbe standard)

Reagents (Réactifs) > Other (Autre)

Ramp Speed (Vitesse de rampe) > Standard

Dans **Setup** (Configuration) > ouvrir **Plate Setup** (Configuration plaque)

Dans l'onglet **Define Targets and Samples** (Définir cibles et échantillons) >

Define Targets (Définir cibles) tel qu'indiqué ci-dessous (définir les couleurs au besoin)

Target Name (Nom de la cible)	Reporter (Rapporteur)	Désactiveur
MgPa	FAM	None (Aucun)
Mutation de l'ARNr 23S	JOE	None (Aucun)
CI	TAMRA	None (Aucun)

Pour permettre la détection automatisée de l'échantillon dans le logiciel d'analyse, assigner des étiquettes d'identification aux puits sur la plaque

Dans **Setup** (Configuration) > ouvrir **Plate Setup** (Configuration plaque)

Dans l'onglet **Define Targets and Samples** (Définir cibles et échantillons) >

Define Samples (Définir échantillons)

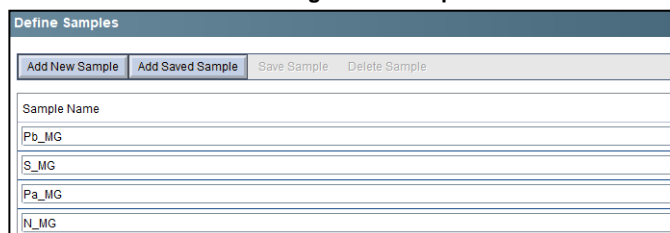
Modifier le **Sample Name** (Nom de l'échantillon) pour qu'il corresponde à l'étiquette d'identification définie dans le module de tests du logiciel d'analyse (voir la **Section 25.3**)

Les échantillons sont étiquetés sous la forme *Préfixe_Suffixe* (comme présenté dans le **Tableau 54** et la **Figure 17**) p.
ex. Pa_MG

REMARQUE : les étiquettes d'identification des échantillons sont sensibles à la casse. L'étiquette d'identification doit correspondre exactement à celle assignée dans le fichier de série.

Tableau 54. Étiquettes d'identification d'échantillon pour le logiciel d'analyse			
Type d'échantillon	Préfixe (dans le logiciel d'analyse)	_ Suffixe (dans le logiciel d'analyse)	Dénomination de l'échantillon (dans 7500 Fast)
Échantillon classique	S	_MG	S_MG
Contrôle négatif	N	_MG	N_MG
Contrôle positif (MG, ARNr 23S de type mutant) (Pa)	Pa	_MG	Pa_MG
Contrôle positif (MG, ARNr 23S de type sauvage) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG

Figure 17. Éditeur d'échantillon – Assignment d'étiquettes d'identification aux puits



Dans l'onglet **Assign Targets and Samples** (Assigner cibles et échantillons) >

Sélectionner les puits et assigner les cibles et les échantillons aux puits sélectionnés

Sélectionner **Passive reference** (Référence passive) > None (Aucune)

Dans **Setup** (Configuration) > ouvrir **Run Method** (Méthode de traitement)

Définir **Reaction Volume Per Well** (Volume de réaction par puits) > 20 µl

Créer le programme suivant (présenté de manière plus détaillée dans Graphical View (Vue graphique) (Figure 18 et la Figure 19) et Tabular View (Vue tabulaire) (Figure 20) :

Tableau 55. Thermocycling Program (Programme de thermocyclage)				
Program name (Nom du programme)	Cycles	Target °C (Cible °C)	Hold (Temps d'arrêt)	Ramp* (Rampe)
Polymerase activation (Activation de la polymérase)	1	95 °C	2 min	100 %
Touch down cycling (Cyclage Touchdown) : Step down (Cyclage par essais : Incrément) -0,5° C/cycle [⊖]	10	95 °C	5 s	100 %
		61°C – 56,5°C [⊖]	30 s	100 %
Quantification cycling (Cyclage par quantification)* : Acquisition/Détection	40	95°C	5 s	100 %
		52°C ⁺	40 s	100 %

* Vitesse de rampe par défaut

⊖ Enable AutoDelta (Activer AutoDelta) : -0,5°C/cycle

+Collect data on hold (Rassembler données en temps d'arrêt)

Figure 18. Méthode de traitement – Graphical View (Vue graphique)

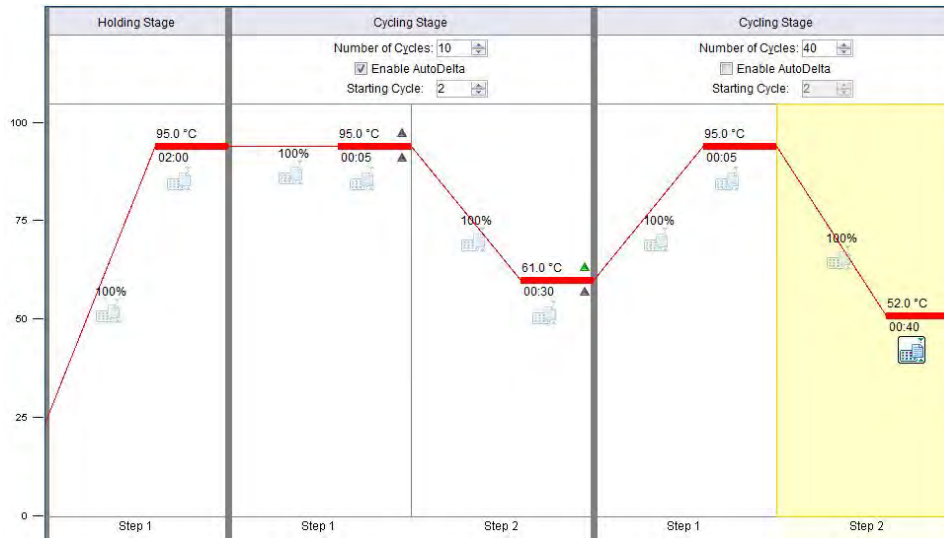


Figure 19. Méthode de traitement – Graphical View (Vue graphique) – Enable AutoDelta (Activer AutoDelta)

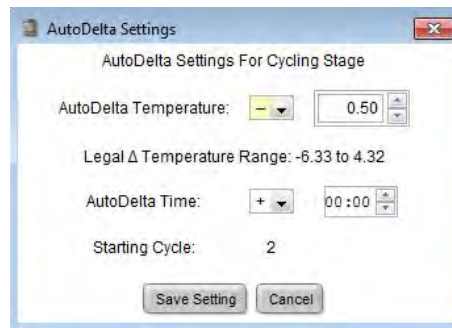


Figure 20. Méthode de traitement – Tabular View (Vue tabulaire)

	Holding Stage	Cycling Stage		Cycling Stage	
		Number of Cycles: 10 <input checked="" type="checkbox"/> Enable AutoDelta Starting Cycle: 2		Number of Cycles: 40 <input type="checkbox"/> Enable AutoDelta Starting Cycle: 2	
Ramp Rate (%)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Temperature (°C)	95.0	95.0	61.0	95.0	52.0
Time	02:00	00:05	00:30	00:05	00:40
AutoDelta Temp:		+ 0.00	- 0.50		
AutoDelta Time:		+ 00:00	+ 00:00		
Collect Data on Ramp:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Collect Data on Hold:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
	Step 1	Step 1	Step 2	Step 1	Step 2

Dans **Setup** (Configuration) > ouvrir **Run Method** (Méthode de traitement)

Sélectionner **Start Run** (Lancer la série)

22.2 Interprétation des résultats

L'interprétation des données nécessite le logiciel d'analyse **ResistancePlus**[®] MG (7500) analysis software. Le logiciel d'analyse peut être fourni sur demande. Contacter tech@speedx.com.au pour de plus amples informations.

Consulter la section **Section 25** pour obtenir les instructions d'utilisation du logiciel d'analyse **ResistancePlus**[®] MG (7500).

23 Annexe 4 : Applied Biosystems® 7500 Fast Dx

Les informations suivantes sont basées sur le logiciel SDS v. 1.4.1 pour le 7500 Fast Dx.

Le kit **ResistancePlus®** MG₍₅₅₀₎ contient les colorants pour le système Applied Biosystems® (ABI) 7500 Fast Dx. Les étalonnages de coloration par défaut sont utilisés pour tous les canaux. Aucun étalonnage personnalisé n'est requis.

23.1 Programmation du système Applied Biosystems® 7500 Fast Dx

Sélectionner Create New Document (Créer nouveau document)

Dans **New Document Wizard** (Assistant nouveau document) sélectionner les options suivantes pour renseigner les champs (**Figure 21**) :

Assay (Test) > Standard Curve (Absolute Quantification) (Courbe standard (Quantification absolue))

Container (Contenant) > 96-Well Clear (96 puits vides transparent)

Template (Modèle) > Blank document (document vide)

Run mode (Mode série) > Standard 7500

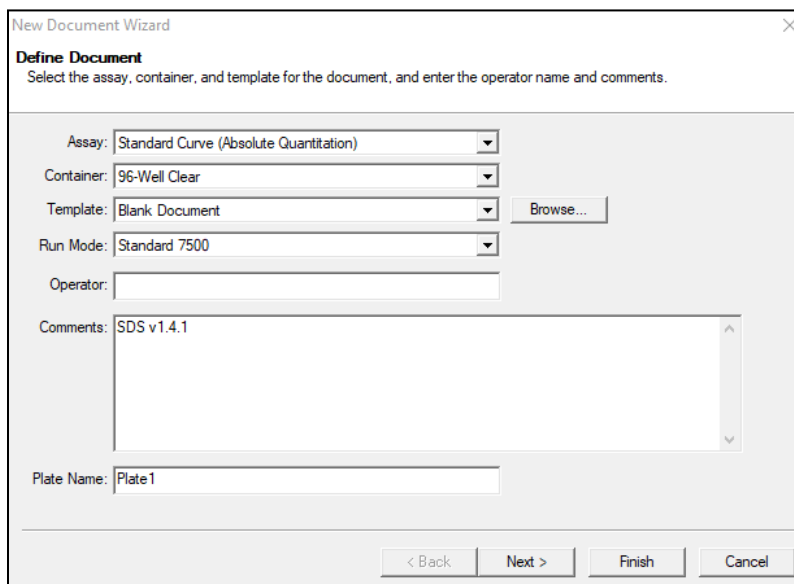
Operator (Opérateur) > Saisir le nom de l'opérateur

Comments (Commentaires) > Saisir tous les commentaires ou les notes supplémentaires pour le fichier de série

Plate Name (Nom de la plaque) > Donner un nom unique au fichier de série

Sélectionner **Next** (Suivant)

Figure 21. Fenêtre New Document Wizard (Assistant nouveau document)



Dans **Select Detectors** (Sélectionner détecteurs) > sélectionner **New Detector** (Nouveau détecteur)

Définir les détecteurs comme indiqué ci-dessous (définir les couleurs au besoin) (indiqué dans le **Table 56** et la **Figure 22**)

Tableau 56. Définir détecteurs			
Détecteurs	Nom du détecteur	Colorant rapporteur	Désactiver
Détecteur 1	MgPa	FAM	None (Aucun)
Détecteur 2	Mutation de l'ARNr 23S	JOE	None (Aucun)
Détecteur 3	CI	TAMRA	None (Aucun)

Sélectionner **OK**

Figure 22. Fenêtre New Detector (nouveau détecteur)

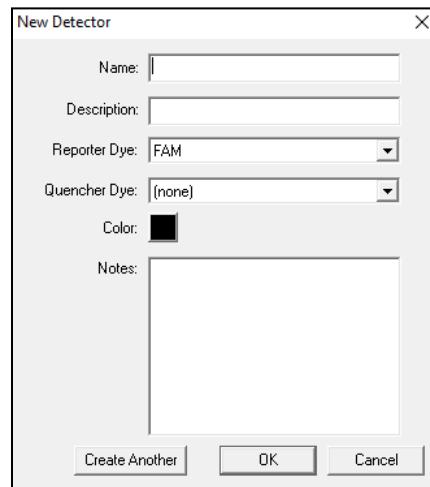
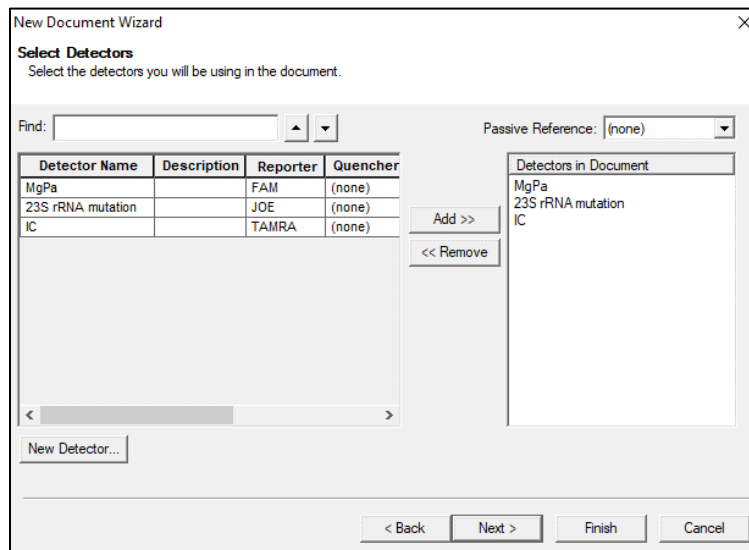

Sélectionner les détecteurs (Figure 23)Sélectionner les détecteurs et **Add** (Ajouter) au documentSélectionner **Passive reference** (Référence passive) > **None** (Aucune)

Figure 23. Fenêtre Select Detectors (Sélectionner détecteurs)



Detector Name	Description	Reporter	Quencher
MgPa		FAM	(none)
23S rRNA mutation		JOE	(none)
IC		TAMRA	(none)

Detectors in Document
MgPa
23S rRNA mutation
IC

Dans **Set up** sample plate (configuration de la plaque d'échantillons) >

Sélectionner les puits et assigner 4 détecteurs aux puits sélectionnés

- MgPa
- Mutation de l'ARNr 23S
- CI

Sélectionner **Next** (Suivant)

Pour permettre la détection automatisée de l'échantillon dans le logiciel d'analyse, assigner des étiquettes d'identification aux puits sur la plaque

Dans l'onglet **Setup > Plate** (Configuration > Plaque)

Faire un clic droit sur le puits et sélectionner **Well Inspector** (Inspecteur de puits) > Renseigner **Sample Name** (Nom de l'échantillon)

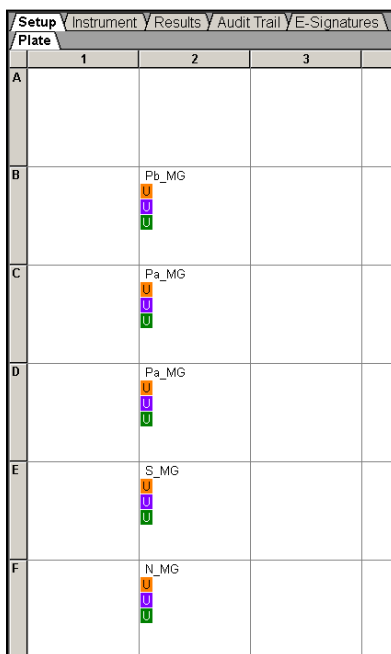
Modifier le **Sample Name** (Nom de l'échantillon) pour qu'il corresponde à l'étiquette d'identification définie dans le module de tests du logiciel d'analyse (voir la **Section 25.3**)

Les échantillons sont étiquetés sous la forme *Préfixe_Suffixe* (comme présenté dans le **Tableau 57** et la **Figure 24**) p. ex. Pb_MG

REMARQUE : les étiquettes d'identification des échantillons sont sensibles à la casse. L'étiquette d'identification doit correspondre exactement à celle assignée dans le fichier de série.

Tableau 57. Étiquettes d'identification d'échantillon pour le logiciel d'analyse			
Type d'échantillon	Préfixe_ (dans le logiciel d'analyse)	_Suffixe (dans le logiciel d'analyse)	Dénomination de l'échantillon (dans 7500 Fast Dx)
Échantillon classique	S	_MG	S_MG
Contrôle négatif	N	_MG	N_MG
Contrôle positif (MG, ARNr 23S de type mutant) (Pa)	Pa	_MG	Pa_MG
Contrôle positif (MG, ARNr 23S de type sauvage) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG

Figure 24. Vue Setup plate (Configuration de la plaque) – Assignment des étiquettes d'identification aux puits



Sélectionner **Next** (Suivant)

Dans l'onglet **Instrument**

Dans la zone **Settings** (Paramètres)

Pour **Sample Volume (µl)** (Volume d'échantillon (µl)) : saisir 20 µl

Créer le protocole suivant de cycleur thermique (**Tableau 58 Figure 25 et Figure 26**)

Tableau 58. Protocole de cycleur thermique				
Program name (Nom du programme)	Cycles	Target °C (Cible °C)	Hold (Temps d'arrêt)	Ramp (Rampe) [≠]
Polymerase activation (Activation de la polymérase)	1	95°C	2 min	100 %
Touch down cycling (Cyclage Touchdown) : Step down (Cyclage par essais : Incrément) -0,5°C/cycle [⊖]	10	95°C	5 s	100 %
		61°C – 56,5°C [⊖]	30 s	100 %
Quantification cycling (Cyclage par quantification) ⁺ : Acquisition/Detection (Acquisition/Détection)	40	95°C	5 s	100 %
		52°C ⁺	40 s	100 %

[≠] Vitesse de rampe par défaut

[⊖] Enable AutoDelta (Activer AutoDelta) : -0,5° C/cycle

⁺ Collect data on hold (Rassembler données en temps d'arrêt)

Figure 25. Protocole de cycleur thermique - Profil thermique

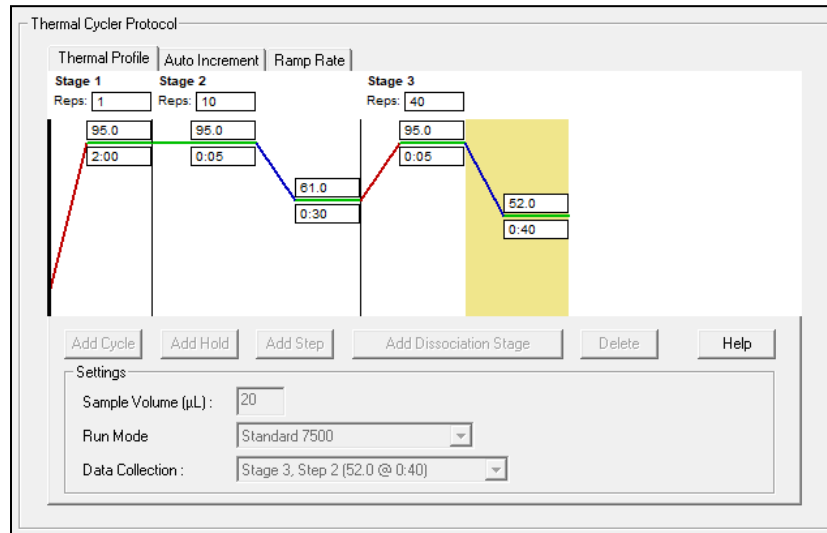
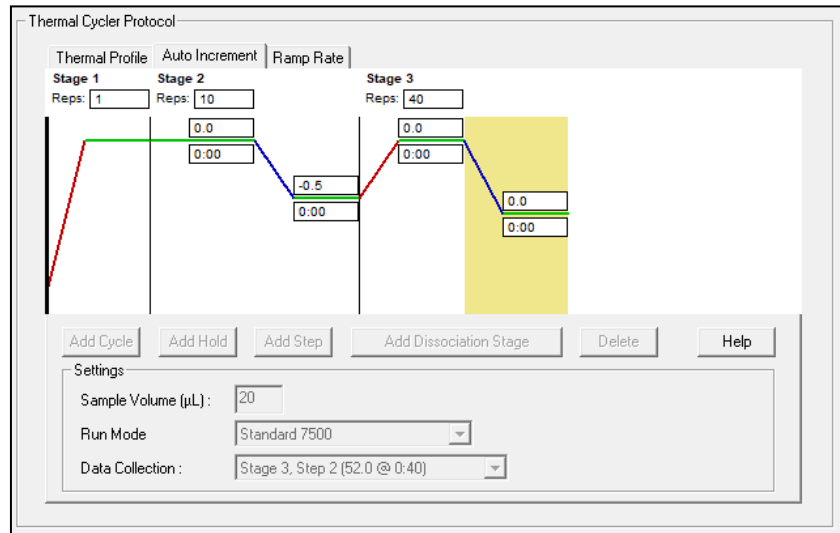


Figure 26. Protocole de cycleur thermique - Incrément automatique



23.2 Interprétation des résultats

L'interprétation des données nécessite le logiciel d'analyse **ResistancePlus**[®] MG (7500) analysis software. Le logiciel d'analyse peut être fourni sur demande. Contacter tech@speedx.com.au pour de plus amples informations.

Consulter la **Section 25** pour obtenir les instructions d'utilisation du logiciel d'analyse **ResistancePlus**[®] MG (7500).

24 Annexe 5 : Systèmes de PCR en temps réel Bio-Rad CFX96™ Dx et CFX96 Touch™

Les informations suivantes sont basées sur le système Bio-Rad CFX Manager v. 3.1

Le kit **ResistancePlus**® MG₍₆₇₅₎ contient les colorants pour le système CFX96 Real-Time PCR System. Les étalonnages de coloration par défaut sont utilisés pour tous les canaux. Aucun étalonnage personnalisé n'est requis.

24.1 Programmation des systèmes de PCR en temps réel CFX96™ Dx et CFX96 Touch™

Sélectionner **View** (Afficher) > ouvrir **Run Setup** (Configuration série)

Dans **Run Setup** (Configuration série) > onglet **Protocol** (Protocole) > sélectionner **Create New** (Créer)

Dans **Protocol Editor** (Éditeur de protocole) (voir la **Figure 27**):

Régler **Sample Volume** (Volume d'échantillon) > 20 µl

Créer le programme de thermocyclage suivant et l'enregistrer sous « **SpeedX PCR** ». Ce protocole peut être sélectionné pour de futures séries.

Pour le Touch down cycling (Cyclage Touchdown), sélectionner l'étape 3 puis **Step options**(Options d'étape) > Increment (Incrément) : -0,5 °C/cycle (présenté plus en détail dans la **Figure 28**).

Tableau 59. Thermocycling Program (Programme de thermocyclage)			
Program name (Nom du programme)	Cycles	Target °C (Cible °C)	Hold (Temps d'arrêt)
Polymerase activation (Activation de la polymérase)	1	95 °C	2 min
Touch down cycling (Cyclage Touchdown) ^δ :	10	95°C	5 s
Step down (Cyclage par essais : Incrément) -0,5 °C/cycle		61°C – 56,5°C ^δ	30 s
Quantification cycling (Cyclage par quantification) ⁺ : Acquisition/Détection	40	95°C	5 s
		52°C ⁺	40 s

^δ **Step options** (Options d'étape) > Increment (Incrément) : -0,5° C/cycle

⁺ **Add Plate Read to Step** (Ajouter lecture de plaque à l'étape)

Figure 27. Thermocycling Protocol (Prototype de thermocyclage) – Graphical view (Vue graphique)

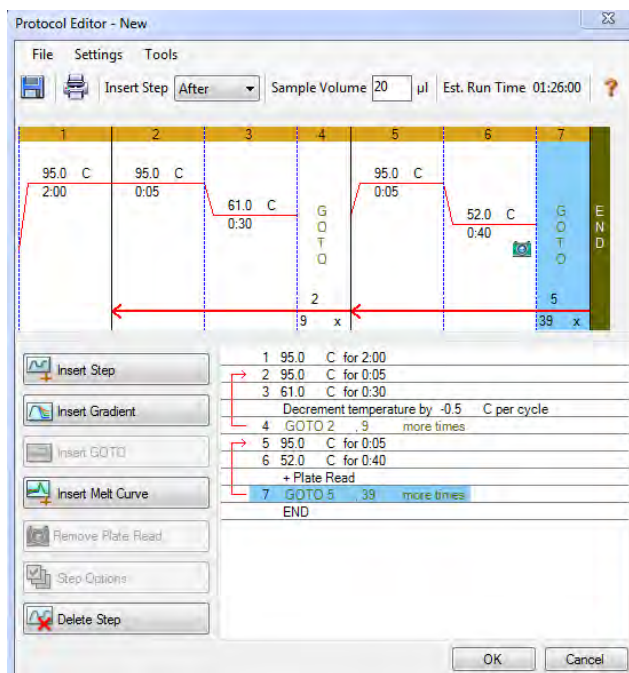
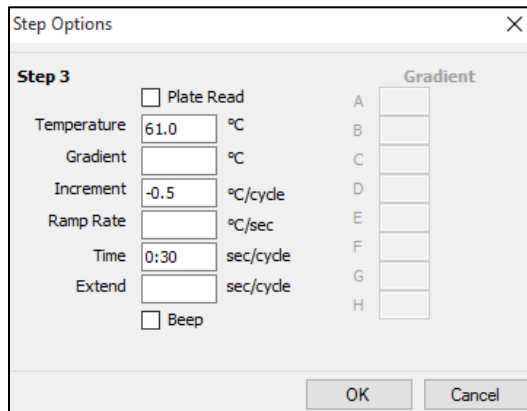


Figure 28. Step Options (Options d'étape)



The screenshot shows the 'Step Options' dialog box for Step 3. The dialog has a title bar 'Step Options' and a close button. The 'Step 3' section contains the following fields:

- Plate Read
- Temperature: 61.0 °C
- Gradient: °C
- Increment: -0.5 °C/cycle
- Ramp Rate: °C/sec
- Time: 0:30 sec/cycle
- Extend: sec/cycle
- Beep

The 'Gradient' section on the right has a vertical list of checkboxes labeled A through H, all of which are currently unchecked. At the bottom of the dialog, there are 'OK' and 'Cancel' buttons.

Dans l'onglet **Run Setup > Plate** (Configuration série > Plaque)

Sélectionner **Create New** (Créer)

Sélectionner **Settings** (Paramètres) > **Plate Type** (Type de plaque) > sélectionner **BR Clear** (BR transparente)

Régler **Scan mode** (Mode balayage) > All channels (Tous les canaux)

Select Fluorophores (Sélectionner Fluorophores) > FAM, HEX, Quasar 705 (voir **Tableau 60**)

Sélectionner les puits contenant des échantillons et assigner le **Sample Type** (Type d'échantillon) puis cocher **Load** (Charger) pour les fluorophores (FAM, HEX, Quasar 705)

Enregistrer la plaque

Tableau 60. Canaux pour les cibles <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎		
Détection de <i>M. genitalium</i> (MgPa)	Mutation de l'ARNr 23S	Internal Control (Contrôle interne)
FAM	HEX	Quasar 705

Dans **Run Setup** (Configuration série) > onglet **Start Run** (Lancer la série)

Sélectionner le bloc

Start Run (Lancer la série)

Pour permettre la détection automatisée de l'échantillon dans le logiciel d'analyse, assigner des étiquettes d'identification aux puits sur la plaque

Ouvrir le module **Plate Setup** (Configuration plaque)

Sélectionner le puits

Modifier le **Sample Name** (Nom de l'échantillon) pour qu'il corresponde à l'étiquette d'identification définie dans le module de tests du logiciel d'analyse (voir la **Section 25.3**)

Les échantillons sont étiquetés sous la forme *Préfixe_Suffixe* (comme présenté dans le tableau **Table 61** et la **Figure 29**)
p. ex. Pb_MG

REMARQUE : les étiquettes d'identification des échantillons sont sensibles à la casse. L'étiquette d'identification doit correspondre exactement à celle assignée dans le fichier de série.

Tableau 61. Étiquettes d'identification d'échantillon pour le logiciel d'analyse			
Type d'échantillon	Préfixe_ (dans le logiciel d'analyse)	Suffixe (dans le logiciel d'analyse)	Dénomination de l'échantillon (dans CFX96)
Échantillon classique	S	_MG	S_MG
Contrôle négatif	N	_MG	N_MG
Contrôle positif (MG, ARNr 23S de type mutant) (Pa)	Pa	_MG	Pa_MG
Contrôle positif (MG, ARNr 23S de type sauvage) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG

Figure 29. Sample Editor (Éditeur d'échantillons) – Assignment d'étiquettes d'identification aux puits

	1	2	3
A	Unk FAM HEX Quasar 705 S_MG		
B	Unk FAM HEX Quasar 705 Pa_MG		
C	Unk FAM HEX Quasar 705 Pb_MG		
D	Unk FAM HEX Quasar 705 N_MG		

24.2 Interprétation des résultats

L'interprétation des données nécessite le logiciel d'analyse **ResistancePlus**[®] MG (CFX). Le logiciel d'analyse peut être fourni sur demande. Contacter tech@speedx.com.au pour de plus amples informations.

Consulter la **Section 25** pour obtenir les instructions d'utilisation du logiciel d'analyse **ResistancePlus**[®] MG (CFX) .

25 Annexe A : interprétation des résultats

L'interprétation des données nécessite le logiciel d'analyse **ResistancePlus**® MG. Même si les amorces **PlexPrime**® offrent une meilleure spécificité que d'autres amorces spécifiques d'allèle, certaines amplifications non spécifiques du test de mutant de l'ARNr 23S peuvent être identifiables dans des échantillons à concentrations élevées de l'ARNr 23S de type sauvage de *M. genitalium*. Le logiciel d'analyse **ResistancePlus**® MG automatise l'interprétation des données des résultats d'amplification et rationalise le flux de travail.

Voir le **Tableau 62** pour le logiciel d'analyse approprié pour chaque instrument de PCR en temps réel. Le logiciel d'analyse peut être fourni sur demande. Contacter tech@speedx.com.au pour de plus amples informations.



Tableau 62. Logiciel d'analyse ResistancePlus ® MG		
Réf.	Logiciel d'analyse*	Instrument de PCR en temps réel
99003	ResistancePlus ® MG (LC480)	LC480 II
99018	ResistancePlus ® MG (z480)	z 480
99002	ResistancePlus ® MG (7500)	7500 Fast et 7500 Fast Dx
99008	ResistancePlus ® MG (CFX)	CFX96 Dx et CFX96 Touch
99023	REFLEX ResistancePlus ® MG (LC480)	LC480 II
99024	REFLEX ResistancePlus ® MG (z480)	z 480
99026	REFLEX ResistancePlus ® MG (7500)	7500 Fast et 7500 Fast Dx
99025	REFLEX ResistancePlus ® MG (CFX)	CFX96 Dx et CFX96 Touch

* Consulter le site Web <https://plexpcr.com/products/sexually-transmitted-infections/resistanceplus-mg/#resources> pour s'assurer d'utiliser la toute dernière version du logiciel d'analyse.

REMARQUE : observer les pratiques de laboratoire standard pour le transfert, le signalement et le stockage des résultats afin de prévenir la perte des informations relatives aux échantillons.

Pour des instructions détaillées supplémentaires sur la plate-forme **FastFinder**, consulter **FastFinder Instructions For Use** (mode d'emploi de FastFinder) disponible dans le menu **Help** (Aide).

Pour accéder au menu Help (Aide)

- Ouvrir le menu Start (Démarrer) 
- Sélectionner  ou la section **Help** (Aide) et sélectionner ensuite **Product Documentation** (Documentation du produit)



25.1 Device set up (Configuration du dispositif) (nouvel utilisateur ou nouveau dispositif)

Consulter **FastFinder Instructions For Use** (mode d'emploi de FastFinder) pour obtenir des instructions détaillées relatives à la configuration du dispositif, accessible depuis le menu **Help** (Aide)

Ouvrir **FastFinder**


- Sélectionner **Devices** (Dispositifs) dans la barre des tâches

- > Sélectionner **Add** (Ajouter)
- > Sélectionner un fichier (fichier de série) pour le nouveau dispositif
- Pour changer le Current directory (Répertoire actuel)
 - > Sélectionner **Browse** (Naviguer) et sélectionner le dossier contenant les fichiers utiles
 - > Sélectionner **Next** (Suivant)
- Ajouter les informations sur le dispositif
 - > Sélectionner **Save** (Enregistrer)

25.1.1 Compensation de couleur


REMARQUE : consulter la **Section 20.2** et **Section 21.2** pour plus d'informations sur la Colour Compensation (Compensation de couleur)

Un fichier de compensation de couleur doit être ajouté aux dispositifs **LC480 II** et **z 480**

- Sélectionner le dispositif LC480 II ou le dispositif z 480
 - > Dans la section **Colour Compensation** (Compensation de couleur), sélectionner 
 - > Sélectionner le fichier de compensation de couleur pour le dispositif dans le répertoire
- Pour changer le Current directory (Répertoire actuel)
 - > Sélectionner **Browse** (Naviguer) et sélectionner le dossier contenant les fichiers utiles
- Sélectionner **Next** (Suivant)
- Sélectionner **ResistancePlus MG (LC480)**, **ResistancePlus MG (z480)**, **REFLEX ResistancePlus MG (LC480)**, ou **REFLEX ResistancePlus MG (z480)** dans la liste, pour établir un lien avec ce test
- Sélectionner **Save** (Enregistrer)

De nouveaux fichiers ou des fichiers complémentaires de compensation de couleur peuvent être ajoutés à un dispositif ou désactivés au besoin.

Dans la section Compensation de couleur du dispositif

- En regard du nom du fichier, sélectionner 
- Sélectionner  pour activer ou désactiver un fichier de compensation de couleur pour un test
- Sélectionner **Save** (Enregistrer)

25.2 **Module de test (nouvel utilisateur)**



Consulter **FastFinder Instructions for use** (Mode d'emploi de FastFinder) pour obtenir des instructions détaillées relatives à la configuration des tests, accessible à partir du menu **Help** (Aide)

Ouvrir **FastFinder**

- Sélectionner **Assays** (Tests) dans la barre des tâches
- Sélectionner **Add** (Ajouter)
 - > Pour le LC480 II > Sélectionner **ResistancePlus MG (LC480)** dans la liste
 - > Pour le z 480 > Sélectionner **ResistancePlus MG (z480)** dans la liste
 - > Pour le 7500 Fast et 7500 Fast Dx > Sélectionner **ResistancePlus MG (7500)** dans la liste
 - > Pour le CFX96 Dx et CFX96 Touch > Sélectionner **ResistancePlus MG (CFX)** dans la liste
 - > Pour l'analyse des échantillons extraits sans CI sur le LC480 (flux de travail reflex) > sélectionner **REFLEX ResistancePlus® MG (LC480)** dans la liste

- > Pour l'analyse des échantillons extraits sans CI sur le z 480 (flux de travail reflex) > sélectionner **REFLEX ResistancePlus® MG (z480)** dans la liste
- > Pour l'analyse des échantillons extraits sans CI sur le z 480 (flux de travail reflex) > sélectionner **REFLEX ResistancePlus® MG (7500)** dans la liste
- > Pour l'analyse des échantillons extraits sans CI sur le LC480 (flux de travail reflex) > sélectionner **REFLEX ResistancePlus® MG (CFX)** dans la liste
- Sélectionner **Add** (Ajouter)





Pour activer ou désactiver les versions du module de test

- Dans General assay information (Information générale relative au test)
 - > Sélectionner  Versions
 - > Sélectionner  pour activer ou désactiver la version du test
 - > Sélectionner **Save** (Enregistrer)

25.3 Dénomination des échantillons

Des étiquettes d'identification d'échantillon peuvent être assignées à un module de test pour automatiser la détection des puits et des types d'échantillon pour l'analyse.

Sélectionner **Assays** (Tests) dans la barre des tâches

- Dans les étiquettes d'identification du type d'échantillon (préfixe), sélectionner 
 - > Sélectionner  pour ajouter une étiquette d'identification afin de définir les étiquettes d'identification de types d'échantillon (contrôle négatif, contrôle(s) positif(s) et échantillon classique)
 - > Ajouter le mot, l'acronyme ou la lettre souhaité dans le champ de texte
 - > Sélectionner **Save** (Enregistrer)
- Dans les étiquettes d'identification de la définition du mélange (suffixe), sélectionner 
 - > Sélectionner  pour ajouter une étiquette d'identification et définir le nom du mélange
 - > Ajouter le mot, l'acronyme ou la lettre souhaité dans le champ de texte
 - > Sélectionner **Save** (Enregistrer)
- Dans le logiciel de l'appareil (avant ou après que la série soit terminée), assigner la même étiquette d'identification aux puits appropriés
 - > Pour le **LC480 II** consulter la **Section 20** ou pour obtenir des instructions sur la programmation des étiquettes d'identification d'échantillon dans le fichier de série
 - > Pour le **z 480**, consulter la **Section 21** pour obtenir des instructions sur la programmation des étiquettes d'identification d'échantillon dans le fichier de série
 - > Pour le **7500 Fast**, consulter la **Section 22** pour obtenir des instructions sur la programmation des étiquettes d'identification d'échantillon dans le fichier de série
 - > Pour le **7500 Fast Dx** consulter la **Section 23** pour obtenir des instructions sur la programmation des étiquettes d'identification d'échantillon dans le fichier de série
 - > Pour le **CFX96 Dx** et **CFX96 Touch** consulter la **Section 24** pour obtenir des instructions sur la programmation des étiquettes d'identification d'échantillon dans le fichier de série

REMARQUE : les étiquettes d'identification des échantillons sont sensibles à la casse. L'étiquette d'identification doit correspondre exactement à celle assignée dans le fichier de série.

25.4 Ajouter des numéros de lot de mélange

Des numéros de lot de mélange peuvent être assignés au test pour permettre la traçabilité des réactifs

- Sélectionner **Assays** (Tests) dans la barre des tâches

> Dans **Assay Lot (Lot de test)** : sélectionner  pour ajouter un nouveau lot ou sélectionner un lot existant 

> Une fois ajoutés, les numéros de lot sont disponibles dans le module d'analyse

Sélectionner  pour afficher tous les numéros de lot ou seulement les numéros de lot actifs.

Sélectionner **Analyses** (Analyses) dans la barre des tâches pour démarrer une nouvelle analyse

1 Select datafile

Rechercher le fichier à télécharger pour l'analyse depuis un répertoire en particulier


- Pour changer le **Current directory** (Répertoire actuel)
 - > Sélectionner **Browse** (Naviguer) et sélectionner le dossier contenant les fichiers utiles
- Sélectionner run (data) file (traiter le fichier [de données]) dans la liste
 - > Sélectionner **Next step** (Étape suivante)

2 Assign assay(s)


Assigner manuellement à la plaque les informations relatives au test si la dénomination des échantillons n'a pas été configurée dans le module de tests

- Pour le **LC480 II** > Sélectionner **ResistancePlus MG (LC480)**
- Pour le **z 480** > Sélectionner **ResistancePlus MG (z480)**
- Pour **7500 Fast** et **7500 Fast Dx** > sélectionner **ResistancePlus MG (7500)**
- Pour **CFX96 Dx** et **CFX96 Touch** > Sélectionner **ResistancePlus MG (CFX)**
- Pour l'analyse des échantillons extraits sans CI sur le **LC480** > sélectionner **REFLEX ResistancePlus® MG (LC480)**
- Pour l'analyse des échantillons extraits sans CI sur le **z 480** > sélectionner **REFLEX ResistancePlus® MG (z480)**
- Pour l'analyse des échantillons extraits sans CI sur le **7500 Fast** et le **7500 Fast Dx** > Sélectionner **REFLEX ResistancePlus® MG (7500)**
- Pour l'analyse des échantillons extraits sans CI sur le **CFX96 Dx** et le **CFX96 Touch** > Sélectionner **REFLEX ResistancePlus® MG (CFX)**
- Sélectionner les puits et les assigner en tant que :
 - > Échantillon classique (S)
 - > Contrôle négatif (N)
 - > Contrôle positif (MG, ARNr 23S de type mutant) (Pa)
 - > Contrôle positif (MG, ARNr 23S de type sauvage) (Pb)
- Sélectionner **Next step** (Étape suivante)

Pour enregistrer la disposition de la plaque comme modèle pour des utilisations futures

- Sélectionner les puits et assigner des types d'échantillons
 - > Sélectionner  pour enregistrer le modèle
- Indiquer le nom de modèle pour les utilisations futures
 - > Sélectionner **Save** (Enregistrer)

Pour charger un modèle de plaque précédemment enregistré

- Sélectionner  pour charger un modèle de plaque
 - > Sélectionner le modèle dans le menu déroulant
 - > Cocher la case pour charger les types d'échantillons spécifiés dans le modèle de plaque
 - > Sélectionner **Load** (Charger)

3 Configure assay(s)

- Pour le **LC480 II** > Sélectionner **ResistancePlus MG (LC480)**
 - > Sélectionner le fichier de compensation de couleur approprié dans le menu déroulant
 - > Sélectionner le **Assay Lot** (Lot de tests) dans le menu déroulant
 - > Sélectionner **Analyse** (Analyser)

- Pour le **z 480** > Sélectionner **ResistancePlus MG (z480)**
 - > Sélectionner le fichier de compensation de couleur approprié dans le menu déroulant
 - > Sélectionner le **Assay Lot** (Lot de tests) dans le menu déroulant
 - > Sélectionner **Analyse** (Analyser)

- Pour **7500 Fast** et **7500 Fast Dx** > sélectionner **ResistancePlus MG (7500)**
 - > Sélectionner le **Assay Lot** (Lot de tests) dans le menu déroulant
 - > Sélectionner **Analyse** (Analyser)

- Pour **CFX96 Dx** et **CFX96 Touch** > Sélectionner **ResistancePlus MG (CFX)**
 - > Sélectionner le **Assay Lot** (Lot de tests) dans le menu déroulant
 - > Sélectionner **Analyse** (Analyser)

- Pour les échantillons extraits sans CI (flux de travail reflex) sur le **LC480 II** > sélectionner **REFLEX ResistancePlus MG (LC480)**
 - > Sélectionner le fichier de compensation de couleur approprié dans le menu déroulant
 - > Sélectionner le **Assay Lot** (Lot de tests) dans le menu déroulant
 - > Sélectionner **Analyse** (Analyser)

- Pour les échantillons extraits sans CI (flux de travail reflex) sur le **z 480** > sélectionner **REFLEX ResistancePlus MG (z480)**
 - > Sélectionner le fichier de compensation de couleur approprié dans le menu déroulant
 - > Sélectionner le **Assay Lot** (Lot de tests) dans le menu déroulant
 - > Sélectionner **Analyse** (Analyser)

- Pour les échantillons extraits sans CI (flux de travail reflex) sur le **7500 Fast** et le **7500 Fast Dx** > Sélectionner **REFLEX ResistancePlus MG (7500)**
 - > Sélectionner le **Assay Lot** (Lot de tests) dans le menu déroulant
 - > Sélectionner **Analyse** (Analyser)


- Pour les échantillons extraits sans CI (flux de travail reflex) sur le **CFX96 Dx** et le **CFX96 Touch** > Sélectionner **REFLEX ResistancePlus MG (CFX)**
 - > Sélectionner le **Assay Lot** (Lot de tests) dans le menu déroulant


- > Sélectionner **Analyse** (Analyser)

25.6 Résultats

Consulter le **Tableau 63** pour obtenir un résumé des résultats possibles d'échantillon signalés.

REMARQUE : il est fortement recommandé de confirmer les courbes d'amplification pour tous les échantillons positifs.

Pour corriger tout résultat incertain 

- Sélectionner l'onglet **Resolve** (Corriger)
- Sélectionner un échantillon à corriger
- Inspecter les courbes d'amplification pour les résultats incertains
 - > Sélectionner pour tracer une courbe de référence sur le graphe
 - > Sélectionner pour tracer un contrôle positif sur le graphe
 - > Sélectionner pour tracer un contrôle négatif sur le graphe
 - > Sélectionner pour confirmer le résultat suggéré ou sélectionner  une autre option
- Confirmer comme **Negative** (Négatif) ou **Inconclusive** (Non concluant) et ajouter des commentaires


REMARQUE : pour les échantillons non concluants, effectuer une nouvelle extraction et un nouveau test unique. Si l'échantillon n'est toujours pas concluant, prélever un nouvel échantillon pour effectuer un nouveau test.

Pour finaliser l'analyse et éviter d'autres modifications par l'utilisateur

- > Sélectionner **Authorise Analysis** (Autoriser l'analyse)
- > Sélectionner **Yes** (Oui) pour confirmer
- Pour rejeter l'analyse ou la redémarrer
 - > Sélectionner **Restart Analysis** (Redémarrer l'analyse) ou **Reject Analysis** (Rejeter l'analyse)
 - > Sélectionner une des options pour confirmer

25.7 Courbe de référence

Une courbe de référence peut être enregistrée et utilisée pour comparer les échantillons d'une même plaque ou de plaques différentes

- Sélectionner l'échantillon désiré dans le menu **Well Details** (Détails du puits) ou dans le menu **Target Details** (Détails de la cible)
- Dans le menu du graphe d'amplification > sélectionner 
 - > Sélectionner la case à cocher du canal désiré et ajouter une étiquette
 - > Sélectionner **Save** (Enregistrer) pour ajouter le signal comme courbe de référence

Cette courbe de référence s'affiche alors en lien avec le test dans le menu Tests et peut être désactivée à tout moment.

25.8 Aperçu des résultats

Tableau 63. Interprétation des résultats par le logiciel d'analyse [®] MG (onglet Results Overview (Aperçu des résultats))						
	Puits	Nom	Test	Résultat	Valeurs de Cq [^]	Résultats généraux
	A1	Échantillon 1	ResistancePlus MG	Négatif	CANAL C : 25.31	Échantillon 1 - Négatif M. genitalium non détecté, CI valide
	A2	Échantillon 2	ResistancePlus MG	Positif	CANAL A : 13.35 CANAL B : 24.22 CANAL C : 24.36	Échantillon 2 - Positif M. genitalium détecté, Mutation de l'ARNr 23S non détectée
	A3	Échantillon 3	ResistancePlus MG	Positif	CANAL A : 23.32 CANAL B : 31.64	Échantillon 3 - Positif M. genitalium détecté, Mutation de l'ARNr 23S non détectée
	A4	Échantillon 4	ResistancePlus MG	Positif	CANAL A : 21.32 CANAL B : 23.22 CANAL C : 24.30	Échantillon 4 - Positif M. genitalium, mutation de l'ARNr 23S détectée
	A5	Échantillon 5	ResistancePlus MG	Positif	CANAL A : 23.16 CANAL C : 24.31	Échantillon 5 - Positif M. genitalium, mutation de l'ARNr 23S détectée
	A6	Échantillon 6	ResistancePlus MG	Non valide	CANAL C : 35.02	Échantillon 6 - Non valide CI non valide, refaire le test ¹
⚠	A7	Échantillon 7 (Signalé pour correction)	ResistancePlus MG	Positif	CANAL A : 26.27 CANAL B : 28.11 ² CANAL C : 28.92	Échantillon 7 - Positif ² M. genitalium, mutation de l'ARNr 23S détectée
⚠	A7	Échantillon 7 (Corriger sur non concluant)	ResistancePlus MG	Non valide	CANAL A : 26.27 CANAL C : 28.92	Échantillon 7 - Non valide ³ Résultat non concluant, refaire le test ¹
	B2	Pa (Contrôle positif pour type mutant)	ResistancePlus MG	Positif	CANAL A : 25.01 CANAL B : 24.23	Pa - Positif Contrôle positif valide
	B3	Pb (Contrôle positif pour type sauvage)	ResistancePlus MG	Positif	CANAL A : 25.90	Pb - Positif Contrôle positif valide
	B4	N (Contrôle négatif)	ResistancePlus MG	Négatif	CANAL C : 26.25	N - Négatif Contrôle négatif valide

[^] Consulter le **Tableau 12** pour les noms de canal des différents instruments

¹ Pour les échantillons ayant un CI non valide et ceux non concluants, refaire l'extraction et le test

² Un échantillon avec un Cq incertain est signalé pour correction par ⚠

³ Un échantillon considéré non concluant est signalé par ⚠

25.9 Exporter des résultats

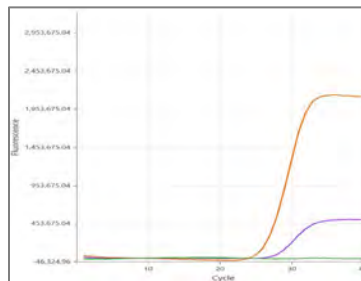
- Pour exporter des résultats
 - > Sélectionner **Exports** (Exportations) dans la barre des tâches
 - > Exporter un ou plusieurs types de rapport suivants : **Cq values list (CSV)** [Liste de valeurs de Cq (CSV)], **Results (CSV)** [Résultats (CSV)], **Generic Amplification CSV** [Amplification générique (CSV)] ou le fichier LIS-integration (Intégration LIS).
 - > Sélectionner **Exports** (Exportations)
- Pour télécharger les exportations
 - > Sélectionner **Reports** (Rapports) dans la barre des tâches
 - > Sélectionner les fichiers et enregistrer
- Sinon exporter un rapport personnalisé
 - > Exporter **Amplification Curve Analysis (PDF)** (Analyse de la courbe d'amplification [PDF])

- > Sélectionner les informations incluses souhaitées (graphes, piste d'audit, aperçu des résultats)
- > Sélectionner les paramètres de rapport souhaités pour personnaliser l'ordre des échantillons
- Sélectionner **Exports** (Exportations)
 - > Ouvrir dans **Report Viewer** (Visionneuse de rapport) pour visualiser, enregistrer et imprimer

25.10 Exemple de graphes pour contrôle

Les exemples suivants montrent les courbes d'amplification (courbes d'amplification corrigées en fonction des valeurs de référence) et l'aperçu des résultats du logiciel d'analyse **ResistancePlus MG (7500)** pour les différents types d'échantillons de contrôle.

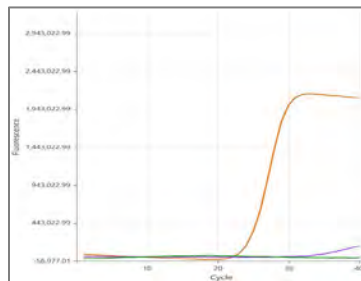
25.10.1 M. genitalium, contrôle pour mutation de l'ARNr 23S (Pa)



CANAL A CANAL B CANAL C

Puits	Nom	Test	Résultat	Valeurs de Cq	Résultats généraux
B1	Pa	ResistancePlus MG	Positif	CANAL A : 26.36 CANAL C : 27.38	Pa - Positif Contrôle positif valide

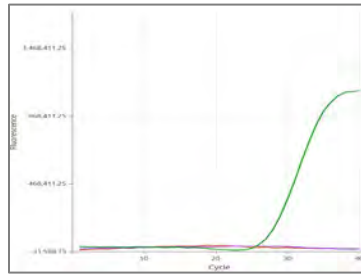
25.10.2 M. genitalium, contrôle ARNr 23S de type sauvage (Pb)



CANAL A CANAL B CANAL C

Puits	Nom	Test	Résultat	Valeurs de Cq	Résultats généraux
D12	Pb	ResistancePlus MG	Positif	CANAL A : 24.30 CANAL B : 34.29	Pb - Positif Contrôle positif valide

25.10.3 *M. genitalium*, contrôle négatif (N) (échantillon négatif)



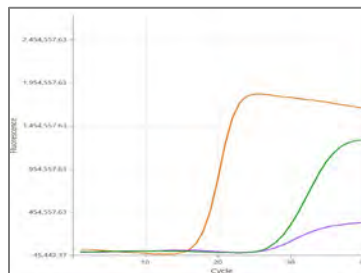
CANAL A CANAL B CANAL C

Puits	Nom	Test	Résultat	Valeurs de Cq	Résultats généraux
D12	N	ResistancePlus MG	Négatif	CANAL C : 27.65	N - Négatif Contrôle négatif valide

25.11 Exemples

Les exemples suivants montrent les courbes d'amplification (courbes d'amplification corrigées en fonction des valeurs de référence) et l'aperçu des résultats du logiciel d'analyse **ResistancePlus MG (7500)** pour les différents échantillons.

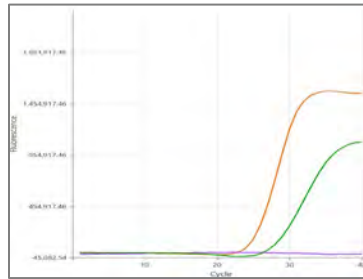
25.11.1 Exemple 1. Échantillon *M. genitalium*, échantillon ARNr 23S de type sauvage avec un nombre faible de copies



CANAL A CANAL B CANAL C

Puits	Nom	Test	Résultat	Valeurs de Cq	Résultats généraux
D2	Échantillon 12	ResistancePlus MG	Positif	CANAL A : 16.34 CANAL B : 26.59 CANAL C : 26.00	Échantillon 12 - Positif M. genitalium détecté, Mutation de l'ARNr 23S non détectée

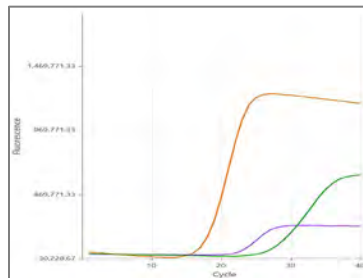
25.11.2 Exemple 2. Échantillon *M. genitalium*, échantillon ARNr 23S de type sauvage avec un nombre faible de copies



CANAL A CANAL B CANAL C

Puits	Nom	Test	Résultat	Valeurs de Cq	Résultats généraux
F1	Échantillon 6	ResistancePlus MG	Positif	CANAL A : 29.30 CANAL C : 28.11	Échantillon 6 - Positif M. genitalium détecté, Mutation de l'ARNr 23S non détectée

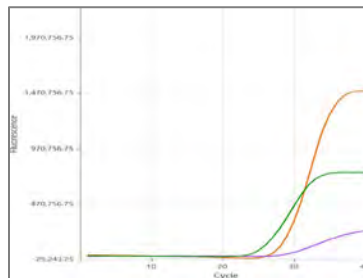
25.11.3 Exemple 3. Échantillon *M. genitalium*, mutation de l'ARNr 23S



CANAL A CANAL B CANAL C

Puits	Nom	Test	Résultat	Valeurs de Cq	Résultats généraux
G3	Échantillon 9	ResistancePlus MG	Positif	CANAL A : 18.08 CANAL B : 22.31 CANAL C : 28.03	Échantillon 9 positif M. genitalium, mutation de l'ARNr 23S détectée

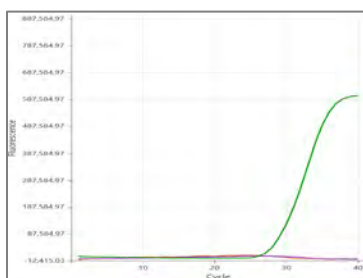
25.11.4 Exemple 4. Échantillon *M. genitalium*, mutation de l'ARNr 23S



CANAL A CANAL B CANAL C

Puits	Nom	Test	Résultat	Valeurs de Cq	Résultats généraux
E3	Échantillon 21	ResistancePlus MG	Positif	CANAL A : 29.08 CANAL B : 29.23 CANAL C : 26.13	Échantillon 21 - Positif M. genitalium, mutation de l'ARNr 23S détectée

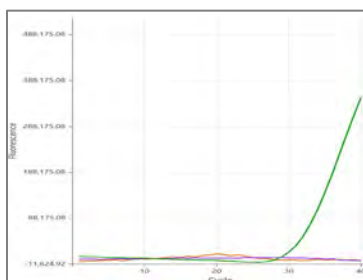
25.11.5 Exemple 5. Échantillon négatif



CANAL A CANAL B CANAL C

Puits	Nom	Test	Résultat	Valeurs de Cq	Résultats généraux
E3	Échantillon 73	ResistancePlus MG	Négatif	CANAL C : 29.23	Échantillon 73 - Négatif M. genitalium non détecté, CI valide

25.11.6 Exemple 6. Échantillon Non valide



CANAL A CANAL B CANAL C

Puits	Nom	Test	Résultat	Valeurs de Cq	Résultats généraux
E3	Échantillon 35	ResistancePlus MG	Non valide	CANAL C : 31.16	Échantillon 35 - Non valide CI non valide, refaire le test

Dans cet exemple, le signal CI est en dehors des limites de seuil du canal. Pour les échantillons ayant un CI non valide, refaire l'extraction, puis refaire le test.

25.11.7 Exemple 7. Échantillons à corriger – Signal négatif

Dans cet exemple, le CANAL B (JOE) a été marqué pour correction et le logiciel suggère que l'échantillon est négatif (Figure 30).

Figure 30. Échantillons à corriger tels qu'ils sont visualisés dans le menu Resolve (Corriger) du logiciel d'analyse

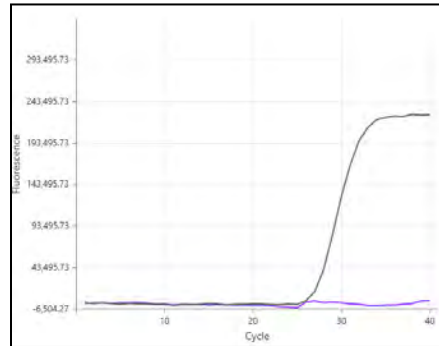
Target	Channel	Cq	Curve result	Info
MgPa	FAM	21.32	Positive	M. genitalium detected
23S rRNA mutation	JOE	---	Negative	Mutant not detected
IC	TAMRA	27.31	Positive	

Pour déterminer l'action appropriée à prendre en vue de la correction, tracer un autre échantillon ou contrôle pour une comparaison des signaux.

- Sélectionner pour tracer une courbe de référence positive (précédemment enregistrée) pour le CANAL B (JOE)

- Sélectionner P pour tracer un contrôle positif de la série
- Sélectionner N pour tracer un contrôle négatif de la série

CANAL B



Après l'inspection des courbes d'amplification (ci-dessus), on peut voir qu'il n'y a aucune amplification dans le canal.

Le résultat est corrigé en sélectionnant l'icône , pour confirmer la suggestion de négatif du logiciel. Le résultat corrigé est affiché dans la **Figure 31** ci-dessous.

Figure 31. Résultat corrigé tel qu'il est visualisé dans le menu Resolve (Corriger) du logiciel d'analyse

Target	Channel	Cq	Result	Info	
MgPa	FAM	21.32	Positive	M. genitalium detected	
23S rRNA mutation	JOE	—	Negative	Mutant not detected	
IC	TAMRA	27.31	Positive		

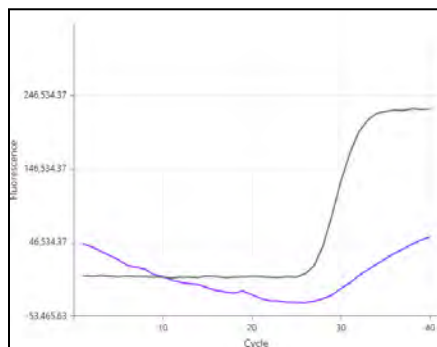
25.11.8 Exemple 8. Échantillons à corriger – Signal non concluant

Dans cet exemple, le CANAL B (JOE) a été marqué pour correction et le logiciel suggère que l'échantillon est positif (Figure 32).

Target	Channel	Cq	Curve result	Info
MgPa	FAM	26.27	Positive	M. genitalium detected
23S rRNA mutation	JOE	28.11	Positive	Mutant detected
IC	TAMRA	28.92	Positive	

Pour déterminer l'action appropriée à prendre en vue de la correction, tracer un autre échantillon ou contrôle pour une comparaison des signaux.

- Sélectionner pour tracer une courbe de référence positive (précédemment enregistrée) pour le CANAL B (JOE)
- Sélectionner pour tracer un contrôle positif de la série
- Sélectionner pour tracer un contrôle négatif de la série



Après l'inspection des courbes d'amplification (ci-dessus), il y a une amplification potentielle dans le canal.

Il est recommandé de corriger en Inconclusive (non concluant), en sélectionnant l'icône et en sélectionnant Inconclusive (Non concluant) dans le menu déroulant. Des commentaires peuvent être ajoutés à la piste d'audit de l'échantillon. Refaire l'extraction et le test sur l'échantillon. Le résultat corrigé est affiché dans la Figure 33 ci-dessous.

Voir le Tableau 63, échantillon 7, pour découvrir comment les résultats sont affichés avant et après la correction dans l'onglet Results Overview (Aperçu des résultats).

Target	Channel	Cq	Result	Info
MgPa	FAM	26.27	Positive	M. genitalium detected
23S rRNA mutation	JOE	28.11	Inconclusive	Mutant detected
IC	TAMRA	28.92	Positive	

26 Glossaire



Conformité européenne
Pour usage de diagnostic *in vitro*



Référence catalogue



Code de lot



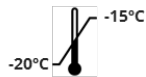
Représentant autorisé
Dans la Communauté européenne



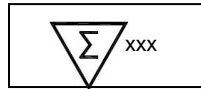
Fabricant



Date de fabrication



Limite de température



Quantité suffisante pour
xxx déterminations



Date de péremption

Les produits SpeedX peuvent être couverts par un ou plusieurs brevets locaux ou étrangers. Consulter www.plexpcr.com/patents pour obtenir des informations complètes sur les brevets.

PlexPCR[®], **ResistancePlus**[®], **PlexPrime**[®] et **PlexZyme**[®] sont des marques commerciales appartenant à SpeedX. Les autres droits d'auteur et marques de commerce appartiennent à leurs détenteurs respectifs.

© Copyright 2021 SpeedX Pty. Ltd.